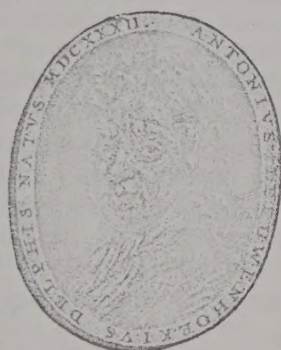




ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR HYGIËNE, MICROBIOLOGIE EN SEROLOGIE

Orgaan van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie



Onder redactie van Prof. Dr. W. C. DE GRAAFF, Hoogleraar a. d. Rijksuniversiteit
te Utrecht en Dr. W. Aeg. TIMMERMAN, Directeur van het
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht.

Vaste medewerkers: Prof. Dr. L. DE BLIECK (Utrecht), Prof. Ir. B. VAN DER BURG (Wageningen), J. P. BIJL (Utrecht), Dr. W. DOORENBOS (Alexandrië), Prof. Dr. P. C. FLU (Leiden), Dr. T. FOLPMERS (Rotterdam), Dr. J. A. VAN HASSELT (Amsterdam), Dr. J. VAN DER HOEDEN (Utrecht), Prof. G. KAPSENBERG (Groningen), Prof. A. KLEIN (Den Haag), Prof. Dr. A. J. KLUYVER (Delft), Prof. Dr. J. J. VAN LOGHEM (Amsterdam), Dr. P. A. MEERBURG (Bussum), Dr. S. L. SCHOUTEN (Utrecht), Prof. Dr. W. A. P. SCHÜFFNER (Amsterdam), Prof. Dr. J. SMIT (Wageningen), A. J. VITRINGA (Amsterdam), Prof. Dr. JOH. WESTERDIJK (Baarn).

DEEL V.

N.V. SWETS EN ZEITLINGER
BOEKHANDEL EN UITGEVERSMAATSCHAPPIJ, AMSTERDAM
1938

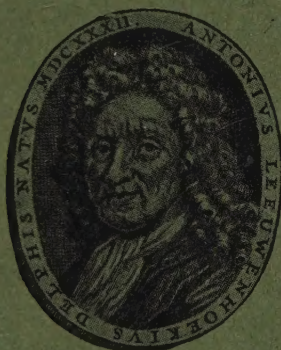
INHOUD JAARGANG 1938.

	blz.
Dr. J. K. BAARS, Glucose-dissimilatie door <i>Vibrio cholerae</i> en <i>Vibrio El Tor</i>	43
H. BEEUWKES en F. A. BANNINK, Over het gebruik van glutaminezuur in een synthetische voedingsbodem bij het biochemisch onderzoek van pathogene darmbacteriën en over phenolrood als indicator in de lactoseagarplaat	35
H. A. DIDDENS, Saltaties bij Schimmels	112
Prof. Dr. P. C. FLU, Het kation $Mg^{\pm\pm}$ en de lysis van <i>Bacterium megatherium</i> door den Bacteriophage <i>antimegatherium</i>	74
Dr. T. FOLPMERS, Waarnemingen betreffende het verdwijnen van faecale streptococci bij filtratieprocessen ter bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater	15
Dr. JAC. JANSEN, Eenige opmerkingen betreffende <i>S. enteritidis</i> var. <i>essen</i>	63
Dr. H. W. JULIUS, In memoriam Prof. L. K. WOLFF	1
Dr. H. W. JULIUS, Een methode voor het tellen van levende bacteriën, vervanging voor de plaatmethode	28
Prof. G. KAPSENBERG, Salmonellose bij den mensch, veroorzaakt door <i>S. enteritidis</i> var. <i>essen</i> , na het eten van visch (snoek)	54
Jonkvr. M. VAN RIEMSDIJK, Een eenvoudige methode tot het zuurstof-vrij maken van het plaatoppervlak voor het kweken van Anaerobionten. De „Ring”-methode	135
Verslag van de Vergadering der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie	4, 67
B. WALCH-SORGDRAGER en H. BOHLANDER, Over de verdeling der leptospirastammen in groepen door middel van de agglutinatielysis reactie	100
F. WESTENDORP BOERMA, Over de verdeling van de agglutinen over de serumeiwitten	86

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR HYGIËNE, MICROBIOLOGIE EN SEROLOGIE

Orgaan van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie



Onder redactie van Prof. Dr. W. C. DE GRAAFF, Hoogleraar a. d. Rijksuniversiteit
te Utrecht en Dr. W. Aeg. TIMMERMAN, Directeur van het
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht.

Vaste medewerkers: Prof. Dr. L. DE BLIECK (Utrecht), Prof. Ir. B. VAN DER BURG
(Wageningen), J. P. BIJL (Utrecht), Dr. W. DOORENBOS (Alexandrië), Prof. Dr.
P. C. FLU (Leiden), Dr. T. FOLPMERS (Rotterdam), Dr. J. A. VAN HASSELT (Amsterdam),
Dr. J. VAN DER HOEDEN (Utrecht), Prof. G. KAPSENBERG (Groningen), Prof. A. KLEIN
(Groningen), Prof. Dr. A. KLUYVER (Delft), Prof. Dr. J. J. VAN LOGHEM (Amsterdam),
Dr. P. A. MEERBUG (Bussum), Dr. S. L. SCHOUTEN (Utrecht),
Prof. Dr. W. A. P. SCHÜFFNER (Amsterdam), Dr. J. SMIT (Amsterdam),
A. J. VITRINGA (Amsterdam), Prof. Dr. JOHA WESTERDIJK (Baarn),

N.V. SWETS EN ZEITLINGER
BOEKHANDEL EN UITGEVERSMAATSCHAPPIJ AMSTERDAM



INHOUD.

	blz.
DR. H. W. JULIUS, In memoriam Prof. L. K. Wolff	1
Verslag van de Vergadering der Nederlandsche Vereeniging voor Micro- biologie	4
DR. T. FOLPMERS, Waarnemingen betreffende het verdwijnen van faecale streptococcen bij filtratieprocessen ter bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater	15
DR. H. W. JULIUS, Een methode voor het tellen van levende bacteriën, vervanging voor de plaatmethode	28
H. BEEUWKES en F. A. BANNINK, Over het gebruik van glutaminezuur in een synthetische voedingsbodem bij het biochemisch onderzoek van pathogene darmbacteriën en over phenolrood als indicator in de lactoseagarplaat	35
DR. J. K. BAARS, Glucose-dissimilatie door <i>Vibrio cholerae</i> en <i>Vibrio</i> <i>El Tor</i>	43
PROF. G. KAPSENBERG, Salmonellose bij den mensch, veroorzaakt door <i>S. enteritidis</i> var. <i>essen</i> , na het eten van visch (snoek)	54
DR. JAC. JANSEN, Eenige opmerkingen betreffende <i>S. enteritidis</i> var. <i>essen</i>	63



In Memoriam Prof. L. K. WOLFF

Op 17 Juni overleed te Utrecht, na een zeer kortstondige ziekte, bijna 59 jaar oud, Prof. L. K. Wolff, Hoogleeraar in de Bacteriologie en Hygiëne aan de Utrechtsche Universiteit. Hij werd midden in zijn werk weggerukt: Tijdens een vergadering van de Staatscommissie tot onderzoek van den gezondheids- en voedingstoestand der werkloozen te 's-Gravenhage kondigde het einde zich aan; dank zij daadwerkelijke hulp is het hem gegeven geweest thuis de laatste rust te vinden. Met hem is stellig een bijzonder mensch uit de rij der mannen, wier leven in dienst der menschheid staat, weggevallen.

Menschen zooals Prof. Wolff treft men helaas te weinig aan. Wie hem van nabij heeft gekend weet, dat zijn wijdvertakte belangstelling zooveel gebieden omvatte, dat men telkens weer verbaasd stond over zijn kennis en kunde. Doch wellicht nog belangrijker dan dat, was zijn diepe menscheijkheid. Hij was een man, die alle uiterlijk vertoon verafschuwde, die een sfeer van waarheid en oprechtheid om zich heen verspreidde en die, waar het in zijn vermogen lag om te geven, tegen moeite noch zorgen opzag om de belangen van anderen te dienen.

Wil men zijn werk karakteriseeren, dan zegt veelzijdigheid nog niet voldoende. Opofferingsgezindheid voor al wat wetenschappelijk belang had en taaie volharding bij het bestudeeren van de vraagstukken, die hij binnen zijn gezichtskring had betrokken, gaven er altijd een bijzonder karakter aan. Het is kenmerkend voor zijn wijze van werken, dat hij nimmer zich beperkte tot één onderwerp, doch altijd verschillende vraagstukken tegelijk behartigde. Dit was reeds in het begin van zijn loopbaan het geval. Na zijn schooljaren te Den Haag en Amsterdam werd hij alumnus van de Amsterdamsche Universiteit en studeerde eerst scheikunde. Direct bleek, dat de fundamente van de wetenschap hem meer boeiden dan het detailwerk.

De colloidchemie, nog maar pas in de eerste stadia van haar triomfantelijke loopbaan, was juist iets voor hem. Doch hij wilde nader tot het leven staan: in 1905, dus 26 jaar oud, deed hij te Amsterdam artsexamen en werd onmiddellijk daarop assistent bij Prof. Straub en bekwaamde zich in de Oogheelkunde. Onder diens leiding werd zijn aandacht in de richting der veelbelovende bacteriologie en serologie getrokken. Hij heeft steeds een zéér fijn gevoel gehad voor wat belangrijk beloofde te worden onder het vele nieuwe, dat de wetenschap haar volgelingen aanbood. Zoo was hij de eerste, die in ons land de reactie van Wasserman verrichtte, na de techniek zelf in Düsseldorf geleerd te hebben. Na zijn assistententijd bij Prof. Straub vestigde hij zich te Amsterdam als oogarts; tot 1929, toen hij als Hoogleraar naar Utrecht werd geroepen, dus ruim 20 jaar, behartigde hij zijn steeds groeiende praktijk. Hij was assistent van Prof. de Vries en werkte aan het kankerinstituut; in de jaren van de mobilisatie was hij officier van gezondheid en wijdde zich aan epidemiologische vraagstukken; bij Prof. Saltet vond hij gelegenheid zich verder toe te leggen op de bacteriologie en de hygiëne en verzorgde hij het onderwijs aan de studenten. Het zou veel te ver voeren zijn wijdvertakte wetenschappelijke werkzaamheden op den voet te volgen (over 300 publicaties in getal, deels met andere samen, en nog vele, waartoe hij de stoot gaf). Maar het is zeker, dat geen onderwerp door hem aangevat werd, of hij wist er iets bijzonders van te maken. Een origineele gedachte of een scherp genomen experiment vermocht een nieuwe mogelijkheid te ontsluiten of een foutieve meening recht te zetten. Na het overlijden van Prof. Saltet werd Prof. Wolff gast op het laboratorium van Prof. Laqueur te Amsterdam. Allen tijd, die hem buiten de plichten van zijn oogheelkundige praktijk werd gelaten, besteedde hij op het laboratorium en bewerkte er de vraagstukken van bactericidie en voedingsleer. Onmiddellijk heeft hij het lang van de studie van de vitaminen aangevoeld en door daar actief aan deel te nemen heeft hij er veel fundamenteele onderzoeken aan toegevoegd.

Prof. Wolff had uitgesproken zin voor de werkelijkheid. Wetenschap moest bij hem levend zijn. Zoodra zag hij niet in, dat een of andere tak van onderzoek vrucht kon afwerpen voor volksgezondheid, therapie of voor dieper algemeen inzicht of hij betrok het binnen zijn gezichtskring. Ruimschoots heeft hij ook de gemeenschap direct gediend. Zoo was hij lid van de eerste en de tweede commissie inzake de melkvoorziening van Amsterdam; aan het vraag-

stuk van de huisvuilverwijdering der Gemeente wijdde hij zijn krachten. Dit zijn slechts enkele grepen.

Zijn Utrechtsche jaren, helaas veel te weinig in getal, waren voor een groot deel in beslag genomen door het onderwijs. Doch Wolff was gewend geweest meer dan één meester tegelijk te dienen en zijn onvermoeide werkkraft wist de zware taak van docent met wetenschappelijk onderzoek te vereenigen, zoodat beide hun deel volop kregen. Zijn leerlingen zullen zich zijn gemoedelijke verteltrant op de colleges, doorspekt met geestige verhalen uit zijn rijke ervaring, blijven herinneren. Zij zullen gedenken, hoe hij de vraagstukken en het inzicht in de onopgeloste problemen stelde boven de kennis van feiten. De technische opleiding door middel van het practicum bracht hij op hoog peil. Het valt moeilijk te beoordeelen in hoeverre zijn leerlingen in de praktijk er reeds de vruchten van hebben geplukt. Zij zijn nog jong, doch het zou mij niet verwonderen, wanneer zij juist later bij het dagelijksche werk zullen voelen, wat zij van hem mede hebben gekregen.

Als lid van de gezondheidscommissie, van den Gezondheidsraad, van de gemeentelijke en staatscommissie inzake het onderzoek van den gezondheids- en voedingstoestand van de werkloozen leverde hij hygiënisch werk van de eerste orde.

Negen jaar lang leidde hij het laboratorium te Utrecht. Bijna deze geheele periode heb ik hem mijn leermeester mogen noemen en dagelijks heb ik zijn warme hart, dat hij den werkers in zijn omgeving toedroeg, kunnen waardeeren. Het is typeerend voor zijn persoon, dat hij ten allen tijde en voor iedereen klaar stond hem of haar aan te hooren. Hij had geen spreekuur; wie hem noodig had, klopte aan de deur en vond hem bereid tot luisteren en tot raden. Zijn bewegelijke geest vermocht zich onmiddellijk in ieders vragen te verplaatsen; daarbij werd hij geleid door zijn leuze: de persoon gaat vóór de zaak. Is het wonder, dat een ieder voor hem klaar stond? De geest van vriendschap schiep een geest van bereidheid.

Prof. Wolff is heengegaan op het hoogtepunt van zijn werk. Lijden is hem niet geheel bespaard gebleven, doch hij droeg het met een blijheid, die tot voorbeeld strekt. De grondtoon van zijn karakter was optimisme: „moeilijkheden zijn er om opgelost te worden en met den tijd regelen alle dingen zich van zelf.” Moge de herinnering daaraan zijne nabestaanden tot steun zijn. Dat neemt niet weg, dat door zéér velen de leege plaats lang gevoeld zal worden. Na een mooi leven ruste hij in vrede!

H. W. JULIUS

Verslag van de Vergadering der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie

*gehouden Zaterdag 2 April 1938 in het Gemeente Ziekenhuis,
Zuidwal 83, te 's-Gravenhage.*

De voorjaarsvergadering der Vereeniging werd gehouden onder voorzitterschap van Prof. Flu. In het officiële gedeelte werden eerst behandeld:

Ingekomen stukken.

1. Brief van Dr. N. R. Pekelharing met dankzegging voor de f 25.— gezonden voor de Inventarisatie van bibliotheken.
2. Nederlandsch-Indisch Kankerinstituut (Voordrachten van den 6en Bosschadag).
3. Brief van The American Express Cy met mededeeling, dat het uitvoerend comité van 3e Internationale Congres voor Microbiologie (2—9 September 1939 te New-York) genoemde Maatschappij heeft aangewezen als officiële reisbureau.
4. Brief van Prof. Gregory Schwartzman (Mount Sinai Hospital, New-York), dat hij Zaterdagmiddag 14 Mei om 2 uur een voordracht hoopt te houden in het Laboratorium voor Hygiëne te Utrecht.
5. Brief van prof. dr. D. A. de Jongstichting (secretaris Dr. v. Nederveen) met bericht, dat zij, die in aanmerking wenschen te komen voor een geldelijke bijdrage voor een onderzoek, behoorend tot het gebied der Vergelijkende Ziektekunde, voor 1 Mei a.s. zich daarvoor aan zijn adres moeten opgeven.
6. Council for Scientific and Industrial Research, Melbourne, brief over uitwisseling van tijdschriften.

Verslag van den secretaris.

De secretaris, Dr. T. Folpmers, deelt mede, dat het aantal gewone leden thans 140 bedraagt, het aantal temporaire is 9. De gebruikelijke vergaderingen werden gehouden, die goed waren be-

zocht. In de wintervergadering kwam ter sprake het voorstel tot het sluiten van een vast contract met recht van wederopzegging met de firma Swets & Zeitlinger, daar de termijn van het voorloopig contract eind Maart 1938 zou verstrijken. Besloten wordt thans, na discussies over de retributie per lid aan den uitgever ter vergoeding voor het tijdschrift en de, daarmee in direct verband staande, kosten van het lidmaatschap, de firma te verzoeken de onkosten van het tijdschrift te willen nagaan. De secretaris en Dr. van Nederveen zullen daartoe met de firma een bespreking houden.

In de najaarsvergadering trad Prof. dr. G. Grijsns volgens rooster af als bestuurslid. De Voorzitter zegt hem hartelijk dank voor het vele werk in het belang der Vereeniging verricht en stelt namens het Bestuur voor Mej. Prof. dr. Westerdijk te verzoeken bestuurslid te willen worden.

Verslag van de penningmeesteres en begrooting.

De penningmeesteres, Dr. Broek, geeft het volgende

Overzicht der Inkomsten en Uitgaven over 1937:

INKOMSTEN		UITGAVEN	
Saldo 1 Januari 1937 . . .	f 2379.92	Biologische Raad . . .	f 25.00
Aan contributie . . .	- 1167.00	Onkosten secretaris . .	- 44.70
Aan rente over 1937 . .	- 70.41	Idem penningmeesteres	- 8.37
		Vergaderingen	- 77.55
		Inventarisatie van tijdschriften	- 25.00
		Retour contributie . .	- 9.00
		Chèque-recht	- 0.05
		Saldo 1 Jan. 1938 . .	- 3427.66
	f 3617.33		f 3617.33

Balans per 31 December 1937:

BEZITTINGEN		SCHULDEN	
Saldo spaarbank . . .	f 2417.82	Tijdschrift 1936 . . .	f 982.50
Saldo postrekening . .	- 999.61	Tijdschrift 1937 . . .	- 1057.50
		Prof. De Jong-Stichting	
Kas	- 10.23	1937	- 50.00
		Saldo bezit	- 1337.66
	f 3427.66		f 3427.66

Saldo bezit op 31 December 1937 f 1337.66

" " " " " 1936 - 1412.42

Verlies over 1937 f 74.76

De Voorzitter stelt voor, onder dankzegging, kwijting te verleen aan Mej. Broek voor het door haar gevoerde beheer, daar de kascommissie, de hr. Julius en Pondman de boekhouding hebben nagezien en in orde bevonden.

Begroeting over 1938.

Deze luidt als volgt:

INKOMSTEN		UITGAVEN	
Contributie 140 leden .	f 1260.00	Tijdschrift 1936 . . .	f 982.50
„ 9 temp. leden -	22.50	„ 1937 . . .	- 1057.50
Rente	- 72.00	Prof. de Jongstichting	
Nadeelig saldo . . .	- 1005.50	1937	- 50.00
		Prof. de Jongstichting	
		1938	- 50.00
		Biologische Raad . . .	- 25.00
		Inventarisatie van tijdschriften	- 25.00
		Onkosten secretaris . .	- 50.00
		Onkosten penningmeesteres	- 10.00
		Twee vergaderingen .	- 100.00
		Onvoorzien	- 10.00
		f 2360.00	
		f 2360.00	

Daarna komt in behandeling de contributieverhoging.

Het voorstel tot contributie-verhoging naar aanleiding van den brief van de firma Swets met gevraagde vergoeding voor het tijdschrift per lid ad f 10.— geeft aanleiding tot veel discussie. Besloten wordt, dat de hr. van Nederveen en de secretaris de firma zullen bezoeken en bemiddelende voorstellen zullen trachten te doen. Ook wordt voorgesteld de vrije lunch te laten vervallen, waarop van enkele zijden protest komt.

Aanwijzing dag en plaats der najaarsvergadering.

Besloten wordt, op voorstel van het bestuur, de najaarsvergadering te houden op Zaterdag 12 November 1938 in het Laboratorium voor hygiëne te Utrecht.

Wetenschappelijk gedeelte.

Prof. L. K. Wolff spreekt mede namens Dr. H. W. Julius over: De werking van sulfanil-amide in vitro en in vivo.

Nadat Ehrlich een nieuwen weg had gewezen tot genezing van infectieziekten door middel van behandeling met organische synthetische geneesmiddelen (chemotherapie) en inderdaad middelen had gevonden voor genezing van ziekten veroorzaakt door spirochaeten en trypanosomen, heeft men getracht ook geneesmiddelen te vinden voor genezing van bacterieele ziekten. Morgenroth heeft hiertoe vele pogingen gedaan; zijn chininederivaten (optochine, eucupine, vucine) en zijn acridinederivaten (rivanol, trypaflavine) zijn echter vrijwel weer verlaten; het optochine omdat het schadelijke bijwerkingen had, de andere middelen, omdat zij alle de weefsels beschadigden en de phagocytose belemmerden. Daarom heeft de mededeeling van Domagk (*D. Med. Woch.* 61, 251, 1935, 15 Februari) terecht alle aandacht getrokken, omdat het middel prontosil in staat was de streptococconperitonitis van de muis te genezen zonder duidelijke beschadiging der weefsels. Het merkwaardige geval deed zich voor, dat het middel in vitro geheel zonder werking was op streptococcon. Fransche auteurs echter hebben aangetoond, dat het prontosil in het lichaam gesplitst wordt in twee verbindingen, nl. in het amidobenzeensulfonamide (sulfanilamid) en in triamidobenzeen. Het eerste bleek eveneens werkzaam te zijn, het laatste niet. Daarom richtte zich de belangstelling op het eerste preparaat.

Bij een gewoon onderzoek over antiseptische eigenschappen tegenover streptococcon blijkt ook het sulfanilamid geen duidelijke antiseptische werking te bezitten, hoogstens remt het den groei der streptococcon een weinig.

Engelsche onderzoekers (Colebrook c.s.) hebben aangetoond, dat het sulfanilamid in bloed wel bactericide werkt, wanneer er maar weinig streptococcon worden toegevoegd; zoodra men echter gewoon (met veel bacteriën) ent, komt er een duidelijke vermeerdering en treedt zelfs na eenige dagen geen steriliteit op.

Wij hebben nu gevonden, dat het sulfanilamid inwerkt op het deelingsmechanisme der bacteriën; de bacteriën deelen zich eerst eenige keeren in het bloed, dat het sulfanilamide bevat, en pas na eenige deelingen begint de werking: stasis en dood der bacteriën. Hebben ze zich niet in tegenwoordigheid van het sulfanilamid vermenigvuldigd, dan blijft de bactericide werking uit. Iets dergelijks hebben ook Engelsche onderzoekers (Finklestone, Sayliss, Paine en Patrick) gevonden, al schrijven ze de werking toe aan „jong” zijn der bacteriën.

Daarbij echter hebben wij aangetoond, dat het sulfanilamid bijzonder goed door de weefsels wordt verdragen; de leucocyten behouden hun phagocyteir vermogen geheel en al (opsonische index blijft dezelfde in bloed met en zonder sulfanilamid) en ook de weefselculturen groeien in concentraties, sterker dan in vivo worden bereikt, op de gewone manier.

Wij willen er dus op wijzen, dat het sulfanilamide aan een complex van eigenschappen zijn bactericide kracht in vivo dankt: 1e. zijn relatieve onschadelijkheid voor de weefsels van den gastheer, waarbij het phagocyteerend vermogen volkomen blijft behouden; 2e. zijn groote diffusibiliteit door alle weefsels (door andere auteurs gevonden: Marshall c.s.); 3e. zijn aangrijpen op het deellingsmechanisme der bacteriën. Wij wijzen nog op de analogie met de werking van salvarsan en dergelijke preparaten op trypanosomen.

Prof. Smit vraagt of mogelijk het sulfanilamide in de vloeistof wordt gebonden en dit de oorzaak is van de ongewone werking. Spreker antwoordt hierop, dat sulfanilamide niet gebonden wordt in tegenstelling met trypaflavine; het werkt alleen bij een $\text{pH} > 7$.

Ir. J. van Beynum bespreekt: Een gistingsproef voor boterzuurbacteriën.

Ir. J. van Beynum (Bacteriologische Afdeeling, Rijkslandbouwproefstation Hoorn) deed mededeeling over een proef, waarmede in de zuivelpraktijk op eenvoudige wijze boterzuurbacteriën in melk kunnen worden aangetoond. Boterzuurbacteriën van het type *Cl. tyrobutyricum* kunnen in de zuivelindustrie groote nadeelen veroorzaken door de gasontwikkeling, welke zij in kaas kunnen teweegbrengen. Door voeding van het melkvee met silage van slechte kwaliteit, zooals veel voorkomt, wordt de melk sterk met deze schadelijke bacteriën besmet, zoodat een eenvoudige proef om deze bacteriën aan te toonen, van groot nut kan zijn voor de kwaliteitsbeoordeeling van de melk.

Bij de voorgestelde „boterzuurbacteriënproef” wordt de melk zelf als voedingsbodem gebruikt, na toevoeging van een geringe hoeveelheid zoutzuur om de ontwikkeling van bij de proef hinderlijke rottingsbacteriën tegen te gaan, en 0,5 % glucose om den voedingsbodem geschikt te maken voor de zoo belangrijke *Cl. tyrobutyricum*.

De proef wordt uitgevoerd in V-vormige buizen, waarvan het

eene been iets langer is dan het andere en waarvan het korte been gesloten wordt met een rubberstop. Het vloeistofoppervlak in het open been wordt van de lucht afgesloten door een laagje paraffineolie. Na pasteurisatie wordt gekweekt bij 35° — 40° C. en de beoordeeling vindt plaats, wat de gisting betreft, na 3 dagen en wat den geur betreft na 4 dagen. De proef moet in meervoud worden uitgevoerd.

Bij proefnemingen aan de Proefzuivelboerderij bleek bij voeding met kuilvoer van slechte kwaliteit boterzuurgisting in de buizen op te treden bij melkhoeveelheden van 10 en 1 ml, doch de proef was bijna altijd negatief in den zomer (weidegang) en bij stalvoeding zonder silage.

De heer Rottier vraagt of het niet veel eenvoudiger is stopfleschjes te gebruiken, waar o.a. het steriliseeren van gummistoppen aanleiding geeft tot een spoedig bederf daarvan. Spreker antwoordt daarop, dat stopfleschjes voor boterzuurgistingen niet aan te raden zijn met het oog op verontreinigingen van den thermostaat bij de gistingen. Om besmetting van handen en van het laboratorium te voorkomen, is een apparaat als de V-buis, waar de gistende vloeistof in blijft, beter.

Dr. Tasman vraagt waarom niet eerst gepasteuriseerd wordt en daarna zuur toegevoegd. Men zou dan coagulumvorming kunnen vermijden.

Spreker antwoordt daarop, dat bij de gebruikte apparatuur het coagulum, dat door het pasteuriseeren van de zuurgemaakte melk ontstaat, niet het minste bezwaar geeft. Bij een snelle techniek is het noodzakelijk de buizen eerst geheel klaar te maken, dan te pasteuriseeren en hierna in den thermostaat weg te zetten.

Dr. J. W. Pette sprak daarna over: Citroenzuurvergisting door boteraromabacteriën.

Dr. J. W. Pette (Bacteriologische Afdeling, Rijkslandbouwproefstation Hoorn) deed mededeeling over een uitgebreid onderzoek naar de vraag of het van nature in melk aanwezige citroenzuur als de bron mag worden beschouwd van het door aromabacteriën geproduceerde aroma aan boter, bereid uit gezuurden room, en zoo ja, op welke wijze deze aromabacteriën het citroenzuurmolecule afbreken tot de verschillende eindproducten, waarvan het diacetyl het karakteristieke geurbestanddeel is.

Door proeven in synthetisch milieu en door toevoeging van citroenzuur aan melkcultures, waarin door anaerobe zuring het aanwezige citroenzuur zonder vorming van aroma omgezet was, kon de noodzakelijkheid van de aanwezigheid van citroenzuur voor de vorming van het aroma worden bewezen. Dat het citroenzuur ook werkelijk de bron is, bleek uit de constantheid van de som der gevonden hoeveelheden der eindproducten.

Bij het schema van de citroenzuurvergisting door de aromabacteriën werd uitgegaan van de gedachte, dat dit schema in de eerste plaats het verschillend gedrag van aromabacteriën in zuur en neutraal melkmilieu zou moeten kunnen verklaren. In neutraal milieu toch vormen de aromabacteriën slechts koolzuur en azijnzuur en geen verbindingen met 4 koolstofatomen (C_4 -stoffen), in zuur milieu worden naast koolzuur en azijnzuur tevens de C_4 -stoffen diacetyl, acetylmethylcarbinol en butyleenglycol gevormd.

Quantitatieve bepalingen bewezen nu, dat de hoeveelheid gevormd koolzuur in beide gevallen constant is, doch dat er tusschen het azijnzuurgehalte en de C_4 -stoffen een wisselwerking bestaat in dien zin, dat een hooger gehalte aan C_4 -stoffen gepaard gaat met een lager gehalte aan azijnzuur en omgekeerd. Het verband tusschen azijnzuur en C_4 -stoffen is lineair. Dit kon nu verklaard worden door het verschillend gedrag van intermediair ontstaan acetaldehyde, dat eenerzijds een omlegging ondergaat tot azijnzuur en alcohol, anderzijds condenseeren kan tot acetylmethylcarbinol of in het algemeen tot de C_4 -stoffen.

De aanwezigheid van alcohol in neutraal milieu kon worden aangetoond.

Daar de gevormde hoeveelheid C_4 -stoffen in lineair verband tot den zuurgraad bleek te staan, werd de overgang zóó voorgesteld, dat het neutrale milieu als grensgeval van de wisselwerking kan worden beschouwd, terwijl bij toenemenden zuurgraad bovendien de condensatie tot C_4 -stoffen in sterkere mate optreedt.

Zeer waarschijnlijk is pyrodruivenzuur tusschenproduct tusschen het citroenzuur en het acetaldehyde, omdat bleek, dat dit de rol van het citroenzuur bij de aromavorming kan vervangen. Bewezen werd, dat vorming van diacetyl uit acetylmethylcarbinol, zooals deze in de literatuur steeds aangenomen wordt, niet juist kan zijn. Diacetyl ontstaat door rechtstreeksche oxydatie van een tusschenproduct der citroenzuurvergisting, vermoedelijk van het acet-

aldehyde. Het butyleenglycol ontstaat door reductie van acetyl-methylcarbinol en diacetyl.

Het opgestelde schema vereischt, dat per molecule omgezet citroenzuur 2 moleculen CO_2 , 1 à $1\frac{1}{2}$ molecule azijnzuur en $\frac{1}{2}$ à 0 molecule C_4 -stoffen ontstaan. De quantitatieve bepalingen waren hiermede geheel in overeenstemming. De verwachting werd uitgesproken, dat het met behulp van dit schema mogelijk zou zijn praktische gevolgtrekkingen te maken voor de samenstelling en het onderzoek van zuursels voor de boterbereiding.

Dr. Gerretsen vraagt of dit onderzoek beteekenis heeft uit practisch oogpunt.

Spreker antwoordt, dat door een beter begrip van de processen der betreffende bacteriën een betere beoordeeling van de kwaliteit van roomzuursels mogelijk is en de samenstelling der zuursels waarschijnlijk op logischer basis gebracht kan worden.

Voor de pauze trad als laatste spreker nog op Dr. H. W. Julius met het onderwerp: „Een techniek voor het tellen van bacteriën, vervanging voor de plaatmethode”, gevolgd door een demonstratie van het gebruikte toestel en hulpmiddelen.

Deze voordracht is in deze aflevering opgenomen.

De demonstratie vond gretige belangstelling.

Na den koffiemaaltijd hield Dr. R. Th. Scholtens een voordracht over: „Zuuragglutinatie van typhusbacteriën”.

Bij de discussie vraagt prof. Smit of er eenig verband bestaat tusschen uitvlokbaarheid en electrische lading.

Spreker antwoordt, dat Arkwright hierover voor twintig jaar al onderzoekingen gedaan heeft. In de agglutinatiezône, die blijkt af te hangen van het Vi-antigeen treedt ontlading op; in de agglutinatiezône, die afhangt van het H-antigeen, daarentegen niet.

Prof. Dr. G. Kapsenberg spreekt over: „Salmonellose bij den mensch na het nuttigen van gekookte snoek.”

Deze voordracht wordt in een volgende aflevering opgenomen.

Bij de bespreking vraagt Dr. Rochat hoe het mogelijk is, dat wanneer de visch gaar was, dwz., dat het eiwit geocoaguleerd was en de temperatuur dus hooger dan 60° is geweest, er toch paratyphusbacteriën zijn blijven leven.

Spreker antwoordt hierop, dat het onderzochte snoekvleesch door en door gaar was gestoofd; het gelukte zonder moeite om

stukjes voor onderzoek aan de mooten te ontnemen. De visch was even opgekookt en daarna gedurende $1\frac{1}{2}$ uur op het fornuis gestoofd; volgens de huisvrouw tegen de kook aan gehouden. Er moeten bij de verhitting van vleesch en visch wel in het binnenste plekken overblijven, waar de temperatuur niet voldoende hoog stijgt om *Salmonella's* te doden. Uhlenhuth en Hubener (*Handbuch der path. Micro-organismen* 1931, Bd. III, blz. 1617, Elkeles en Standfusz) toonden aan, dat paratyphusbacillen, binnen een worst, aan koken gedurende 2 uur weerstand bieden.

Speciaal met betrekking tot visch is de waarneming van Eckersdorff van belang. Een 15 cm. lange en 10 cm. hooge moot van een snoek werd kunstmatig met paratyphusbacillen geïnfecteerd en daarna gedurende een half uur in een gesloten kookpan gekookt. Het oppervlak van de visch had een temperatuur van 100° , het binnenste van 42° . Toch vertoonde dit binnenste de witte kleur van gekookt vischvleesch. Dit is vreemd en doet wel eenigen twijfel aangaande de juistheid van de temperatuurmeting rijzen. De paratyphusbacillen waren nog in grooten getale in het vischvleesch aanwezig.

Terecht zegt Eckersdorff, dat bij de gewone bereiding van visch in de keuken paratyphusbacillen niet gedood worden. Trouwens hetzelfde neemt men herhaaldelijk bij een vleeschvergiftiging waar. De huishoudelijke toebereiding van *Salmonella's* bevattend vleesch vrijwaart niet tegen het optreden van een *Salmonellose*.

Dr. Folpmers merkt op, dat de infectie van de snoek met paratyphus bacteriën uit het water behalve door de kieuwen, wel door de huid van de visch kan zijn tot stand gekomen. Visschen, welke „flauw” worden, beschadigen door slaan met den staart vaak de huid; dikwijls komen, in het warme jaargetijde, ook huidschimmels bij visschen voor.

In aansluiting met de vorige voordracht besprak Dr. Jac. Jansen het onderwerp: „Eenige opmerkingen over „*Salmonella enteritidis* var. essen.””

Deze voordracht wordt in een volgende aflevering opgenomen.

Bij de discussie vraagt Dr. Wieringa of het gevaarlijk is eendeneieren te eten ook al zijn ze gekookt.

Spreeker antwoordt hierop, dat wanneer eendeneieren 8 minuten gekookt hebben, men wel kan aannemen, dat de *Salmonella's* dood zijn.

Hierna sprak Dr. T. Folpmers over: „Waarnemingen betreffen-

de het verdwijnen van faecale streptococcen bij filtratieprocessen ter bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater.”

Deze voordracht verschijnt in dit nummer.

Bij de discussie deelt Dr. Louwe Kooymans mede, dat hij kortgeleden het onderzoek naar streptococcen in water heeft opgevat. Het bezwaar bij de gewone ophoopingsmethode in glucose-bouillon bij 37° C. is, dat bij vele watermonsters in het microscopische beeld geen duidelijke ketens verschijnen, waardoor het noodig is de aanwezigheid te bewijzen door ze rein te kweken en voorts, dat zich naast streptococcen zeer veel andere bacteriën ontwikkelen.

Door uit te gaan van zure glucosebouillon met pH = 5 kan men den groei van andere organismen in sterke mate onderdrukken. De normale bevestiging van de aanwezigheid van streptococcen, uitstrijken op bloedagar en afenten in glucose-bouillon is in een laboratorium van een waterleiding bezwaarlijk, daar men niet direct over steriel bloed beschikt. Zeer goede resultaten werden verkregen door uitstrijking van de ruwkultuur op lactose-bouillonagar met Ktelluriet (1 : 15000). Hierop ontwikkelen zich vrijwel uitsluitend streptococcen.

Spreeker antwoordt, dat laatstgenoemde selectieve voedingsbodem hem bekend is, doch dat het uitstrijken op vaste voedingsbodems, het reinkweken, enz. te veel tijd vergt, vóórdát het resultaat bekend is. De praktijk eischt, dat het onderzoek op streptococcen evenals op coli in water, bereid uit oppervlaktewater (rivierwater), in 24 uren, hoogstens 2×24 uren afgelopen moet zijn. In den genoemden coffeïne-pepton — 0.1 procent glucose — voedingsbodems bij 37° C., evenals in den vermeldden lactose-peptonvoedingsbodem bij 45° C. worden in dien tijd onder vermelde voorwaarden microscopisch gemakkelijk herkenbare lange ketens (streptococcen) gevormd.

Daarna sprak Prof. Dr. O. Nieschulz over: „Bartonella-infectie bij dieren.”

Van onze huisdieren zijn met bloedparasieten, behorende tot het geslacht Bartonella, hond en rund geïnfecteerd. De bij den hond gevonden parasieten behoreen tot *B. canis* Kikuth. Bij het rund komen misschien meerdere soorten voor. Eenigszins nauwkeurig bekend is alleen *B. (Eperythrozoon) wenyonii* (Adler en Ellenbogen). De identiteit van *B. bovis* Donatien en Lestoquard en *B. sergenti* (Adler en Ellenbogen) is onzeker.

Dr. van Thiel merkt het volgende op: Is het juist, dat anaplasma marginale een parasiet genoemd wordt? Ik dacht, dat men de laatste jaren van meening is, dat anaplasmosis veroorzaakt wordt door een filtreerbaar virus en dat de anaplasma-lichaampjes vergeleken moeten worden met de lichaampjes van Jolly.

Spreker antwoordt hierop: De anaplasma-lichaampjes zijn niet identiek met de lichaampjes van Jolly. Ze staan zeker in aetiologisch verband met een welomschreven ziekte, de anaplasmosis. De anaplasma behooren tezamen met de geslachten Bartonella, Grahamella, Eperythrozoon en Erythrocytozoon tot een aparte groep van micro-organismen, welke alle parasieten van bloedlichaampjes zijn, geen scheiding van kern en protoplasma vertoonen en op de gewone voedingsbodems niet te kweken zijn.

Als laatste spreker deelde Dr. C. van Dorssen iets mede: „Over de eigenschappen van Streptococcus equi.”

Op grond van eigen onderzoek kan worden bevestigd, dat *Streptococcus equi*, de verwekker van *Adenitis Equorum*, een organisme met vaststaande eigenschappen is. Mededeelingen over het voorkomen van echte *Streptococcus equi* stammen, welke lactose en sorbitol vergisten en zuurvormen in melk, moeten in twijfel worden getrokken. Wel blijkt uit literatuur en eigen waarnemingen, dat dergelijke stammen uit droesetter zijn te isoleeren. Uit verrichte infectieproeven bleek echter, dat met deze afwijkende stammen de goedaardige droes niet op te wekken.

Bij de discussie wijst Dr. Folpmers op een juist verschenen publicatie van Sherman over Streptococcen, ook van het paard. Spreker merkt op, dat Streptococcus equinus echter niet pathogeen is zooals Streptoc. equi en een ander organisme is en zegt dank voor de literatuuraanwijzing.

Hierna sloot de Voorzitter te ongeveer vijf uur de drukbezochte en interessante vergadering met een woord van dank aan de sprekers en toehoorders.

Waarnemingen betreffende het verdwijnen van faecale streptococcen bij filtratieprocessen ter bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater

DOOR

Dr. T. FOLPMERS,

Leider van het Waterwerk der Drinkwaterleiding te Rotterdam.

Wil men het verdwijnen van faecale streptococcen bij bovengenoemde processen nagaan, dan dient men allereerst over ophoopingmethoden te beschikken, die met groote waarschijnlijkheid de gezochte organismen sterk op den voorgrond brengen ten opzichte van de overige aanwezige bacteriesoorten. Uit onderzoekingen van Hucker, L. H. Louwe Kooymans, e.a. is nu gebleken, dat volgens hun dissimilatieproducten uit glucose de faecale streptococcen eigenschappen gemeen hebben met de groote groep der melkzuurbacteriën. Uit genoemde suiker toch worden gevormd 95—97 % melkzuur en 3.5—1.5 % azijnzuur.

De voorwaarden, welke melkzuurbacteriën aan een voedingsbodem stellen om goed tot ontwikkeling te komen, zijn:

- 1°. een zeer goede stikstofbron, waarvoor in aanmerking komen, vèrgesplitste peptonen, zooals pepton Poulenc, Difco, Bacto;
- 2°. een gemakkelijk vergistbare suiker.
Dit zijn wel de twee hoofdvoorwaarden. Daarnaast komen een aantal begunstigende voorwaarden, nl.:
- 3°. nagenoeg anäerobie;
- 4°. optimale temperatuur;
- 5°. de cultuurvloeistof moet ongebufferd zijn.

Als optimale temperatuur vindt men voor faecale streptococcen steeds opgegeven 37° C., de lichaamstemperatuur van warmbloedige zoogdieren. De vier eerstgenoemde voorwaarden, alsmede de temperatuur van 37° verschaffen echter aan colibacteriën en nog enkele andere soorten eveneens een optimalen groei, vandaar dat de

ophoopingculturen sterk verontreinigd zijn met verschillende soorten bacteriën. Microscopisch zijn in die culturen de streptococcen vaak moeilijk, soms in het geheel niet te herkennen (diplococcen) en men wordt gedwongen tot het reinkweken op vaste cultuurbodems, waarvoor men dan na 2 dg. cultuur (den 2den dag sterven vele verontreinigende bacteriën af door de sterke zuurvorming der streptococcen) van verschillende voedingsbodems gebruik kan maken. Na het reinkweken volgt dan nog het aantoonen van de positieve Gramkleuring. Deze langdurige techniek is waarschijnlijk wel een der oorzaken, dat het streptococconderzoek in water zoo weinig toepassing heeft gevonden. De 5e voorwaarde heb ik speciaal vermeld, omdat men in het voorschrift van een streptococconophoopingsvloeistof nog wel eens aantreft de toevoeging van een geringe hoeveelheid K fosphaat, hetgeen ten eenenmale onjuist is. Men beliet hierdoor toch de snelle verhooging der waterstofionenconcentratie (verlaging der pH), waardoor verontreinigende bacteriën (colibacteriën, sporevormers) teruggedrongen worden en zelfs wel afsterven.

Een groot aantal proeven is vergelijkenderwijs bij 37° C., genomen om met lagere aanvangs-pH der cultuurvloeistof de colibacteriën wat in hun groei te remmen en de streptococcen een groo-tere kans te geven.

Een pH = 5.5 of 5 remt echter coli niet noemenswaard, wel echter soms de streptococcen, terwijl de ketens tevens korter worden en dus microscopisch moeilijker te herkennen. Een groot voordeel ten gunste van de faecale streptococcen geeft de vervanging van glucose door lactose en wel:

- 1°. omdat vele soorten bacteriën gemakkelijk glucose kunnen assimileeren en dissimileeren, lactose daarentegen veel minder soorten;
- 2°. alle faecaal streptococcen (Enterococcen) lactose dissimileeren;
- 3°. *Streptoc. equinus* (in straatvuil uit paardenfaeces) lactose niet kan vergisten en dus overgroeid wordt.

Nog belangrijker is het echter de ophoopingstemperatuur voor faecale streptococcen tot 45° C. te verhoogen. J. M. Sherman, J. C. Mauer en Pauline Stark vermelden (Journ. of Bacteriology Vol. 33, No. 3, pag. 276, 281) dat voor karakterisatie van de *Enterococcus*-groep, waartoe ook *Streptoc. faecium* behoort, kan dienen het feit,

dat de groei uitstekend is bij 45° C. Door de hoge temperatuur sluit men opnieuw vele mededingende bacteriën uit.

Wat betreft de manier om snel een anaëroben toestand te verkrijgen, kreeg ik de beste resultaten door in diepe vloeistoflagen te kweken, b.v. door in gewone reageerbuizen $\pm 20 \text{ cm}^3$ cultuurvloeistof te brengen (hoogte der cultuurlaag $\pm 10 \text{ cm}$).

Als cultuurvloeistof, welke mij derhalve zeer goed voldoet, gebruik ik thans 1 % lactose, 1 % pepton Poulenc, $\frac{1}{2}$ % NaCl in gedistilleerd water, $p_H = 7.0$ en met lakmoes lichtblauw gekleurd. Bij aanwezigheid van veel streptoc. faecium wordt de lakmoes geheel ontkleurd, behalve een smal randje aan de oppervlakte, dat felrood getint is door de zuurvorming. Reeds na 20—24 uren cultiveeren bij 45° C. wordt de streptococcëntiter microscopisch gevonden. In bovenstaande cultuurvloeistof worden met Maaswater, septic-tankwater, rioolwater, faeces van warmbloedige dieren (paard, koe, varken, hond, mensch) in verschillende verdunningen onder genoemde voorwaarden naast diplococcen en kortere ketens lange kettingen van 12—50 tal individuen gevormd soms 60—200, welke sterk in het oog vallen, ja verdere differentieëring na eenige oefening overbodig maken.

De eisch om in korten tijd, liefst na 24 uren, hoogstens na 2×24 uren den titer van faecaal-indicatoren, waaronder in water, naar mijn meening, vooral vallen faecale coli en faecale streptococcen (Enterococcen) geldt vooral voor waterleidingen, welke oppervlaktewater als grondstof gebruiken, dat faecaal verontreinigd is en welke in continu-bedrijf, dus met geringen reinwatervoorraad, werken.

Voor faecale coli gebruikt men daartoe het beste een voedingsvloeistof, die naast glucose *geen* pepton als stikstofbron, doch een mengsel van gelijke hoeveelheden glutaminezuur en ammoniumlactaat bevat. (Zie „Antonie van Leeuwenhoek”, deel 2 No. 4 1935, blz. 343).

Deze cultuurvloeistof hoopt bij 45° C. faecale coli, tevens echter Aerob. aerogenes op, terwijl faecale streptococcen er niet in kunnen groeien, hetgeen een der belangrijke voordeelen is boven de Eykman-cultuurvloeistof.

Als tweede coli-ophoopingsvloeistof maak ik thans reeds gedurende bijna 2 jaar gebruik van een door trypsine vergesplitste natrium-caseïnaatoplossing met de toevoeging van Naformiaat. In plaats van deze natrium-caseïnaatoplossing zelf te bereiden, kan men met voordeel gebruik maken van een oplossing, die Bacto-Tryptone (Difco) bevat. De bereiding is aldus:

Oplossen tot 1800 cm^3 in gedistilleerd water (heet),
30 gram Bacto-Tryptone,
4 gram K_2HPO_4 ,
1.5 gram NaCl.

Na filtratie door een papierfilter, toevoegen $\pm 19 \text{ cm}^3$ N.HCL. Steriliseeren in het stoombad gedurende 1 uur.

Vervolgens wordt een 20% Na-formiaatoplossing gemaakt en een kristalvioletooplossing (50 mgr. in 100 cm^3), waarvan, na sterilisatie in het stoombad, zooveel worden toegevoegd aan bovenstaande oplossing, dat de vloeistof, waarin na 5-voudige verdunning met het, te onderzoeken water uiteindelijk gekweekt wordt, bevat: 0.3% bacto-tryptone, 0.1% Naformiaat, 1 op miljoen (1 mgr. per L.) kristalvioleto, 0.04% K_2HPO_4 , terwijl de pH ± 6.5 bedraagt. Faecale coli geeft in deze cultuurvloeistof, in geheel gevulde fleschjes, bij 45°C na ± 6 uren indol en tevens gisting. In ophoopingsculturen met verschillende watersoorten bereikt men dit na 24 uren of hoogstens 2×24 uren. De indolvorming schijnt door de toevoeging van Na-formiaat begunstigd te worden, waarbij deze stof als waterstofdonator optreedt voor het tryptofaan, terwijl het mierenzuur zelf geoxydeerd wordt tot water en koolzuur.

Wil men echter toch uit de lactose-peptonophoopingsvloeistof de faecale streptococcen reinkweken, dan verdient het ook hier soms aanbeveling dit eerst na 2×24 uren te doen. De streptococcen hebben in dien tijd door sterke zuurvorming (pH ± 4.5) vele verontreinigende bacteriën doen afsterven.

Voor het reinkweken kan men ook gewone vleeschgelatine of vleeschagar gebruiken, waarop na langen tijd (4—7 dagen) puntvormige kolonies verschijnen. Om den groei te bevorderen, kan men suiker (glucose of lactose 1%) toevoegen en ter gemakkelijker identificeering nog een indicator (chinablauw, lakmoes, lacmoïd) toepassen.

Louwe Kooymans beveelt in zijn dissertatie bloedagarplaten aan, welke echter hun eigenaardige bezwaren hebben (steriel bloed is niet gemakkelijk en overal verkrijgbaar).

Bij deze manier van ophoopen (pepton met een suiker) verkrijgt men in hoofdzaak stammen van *Streptoc. faecium*, andere *Enterococce* stammen worden meestal onderdrukt.

In plaats van de p_H der oorspronkelijke ophoopingsvloeistof te verlagen en daardoor coli en andere verontreinigende bacteriën terug te dringen, kan men volgens de onderzoeken van Sherman en medewerkers in genoemde publicatie ook trachten dit te bereiken door de pH te verhoogen. Zij vermelden toch op blz. 28, onder de „characteristics of primary differential value” voor *Streptoc. faecium*, dat dat organisme goed kan groeien in een oplossing van 0.5% glucose, 1% pepton, pH = 9.6 bij 37°C . De resultaten in dit ophoopingsmilieu waren evenwel wisselend en niet zoo goed als die met

den lactose-voedingsbodem bij 45° C. $\text{pH} = 7.0$, vooral sporen-vormende bacteriën worden niet voldoende onderdrukt. Het zelfde is het geval, wanneer men aan de voedingsvloei-stof glucose 0.5% — pepton 1 %, 6.5 % NaCl toevoegt. Na 2×24 uren groeien b.v. met oppervlaktewater naast sporevormers, evenals in het sterk alkalische medium, streptococcen in korte ketens (2—10 individuen), welke eerst na dien langen cultuurtijd zuur vormen. Bij overenten in den lactose-voedingsbodem zonder zout krijgt men dan dikwijls reïnculturen van streptococcen.

Streptococcen van faecale herkomst zijn dus bestand tegen sterke zoutconcentraties en dit verklaart waarschijnlijk het feit, dat men bij schelpdierenonderzoek (oesters, mossels) uit de uitstrijkingen van lactose-ophoeringsproeven van coli zoo dikwijls Enterococcen krijgt. Waarschijnlijk missen ook de streptococcen in zout water hun natuurlijke vijanden van het zoete water, waarover later nader.

Bij een andere ophoeringsmethode voor faecaal streptococcen maakt men gebruik van de eigenschap, dat ze ook met pepton alleen als koolstof- en stikstofbron genoeg nemen (een onderscheid van de echte melkzuurfermenten), terwijl de groei van andere organismen tegengehouden wordt door 1 % cafeïne toe te voegen en in geheel gevulde fleschjes bij 37° C. te cultiveeren. De samenstelling der oplossing is: 1 % pepton Poulenc, 1 % cafeïne, $\frac{1}{2}$ % NaCl, $\text{pH} = 7.0$, gedest. water, waaraan later ter verbetering van den groei is toegevoegd 0.3 % Liebig's vleeschextract. Colibacteriën worden geheel onderdrukt, soms groeien echter nog wel hinderlijk sporevormende bacteriën. Met septic-tankvocht, rioolwater, faeces, krijgt men na 24 uren met 1 cm^3 . (resp. 1 mgr.) en $\frac{1}{5}$ cm^3 ($\frac{1}{5}$ mgr.) reeds groei en wel bijna uitsluitend van streptococcen met zeer verschillende lengten van ketens van individuen. Na 2×24 uren en zelfs na 3×24 uren treedt streptococcengroei op in de grootere verdunningen tot bv. ± 20.000 streptococcen per mgr. faeces of per cm^3 . vloeistof. De cafeïne mag niet minder dan 1 % bedragen, daar anders weer andere bacteriën op den voorgrond treden. Maakt men van deze ophoeringsproeven uitzaaiingen op gewone vleesch-extractbouillongelatine, dan verkrijgt men na eenige dagen kolonies van verschillende vervloeiende en niet vervloeiende streptococcen; bij proeven met menselijke faeces, allen behoorend tot de groep der Enterococcen; ze groeien nl. evengoed in lactose-pepton bij 45° C. en geven de overige karakteristieke reacties door Sherman en medewerkers genoemd. Zoo verkrijgt men de soorten Streptoc. faecium,

Streptoc. liquefaciens, *Streptoc. zymogenes* in verschillende stammen.

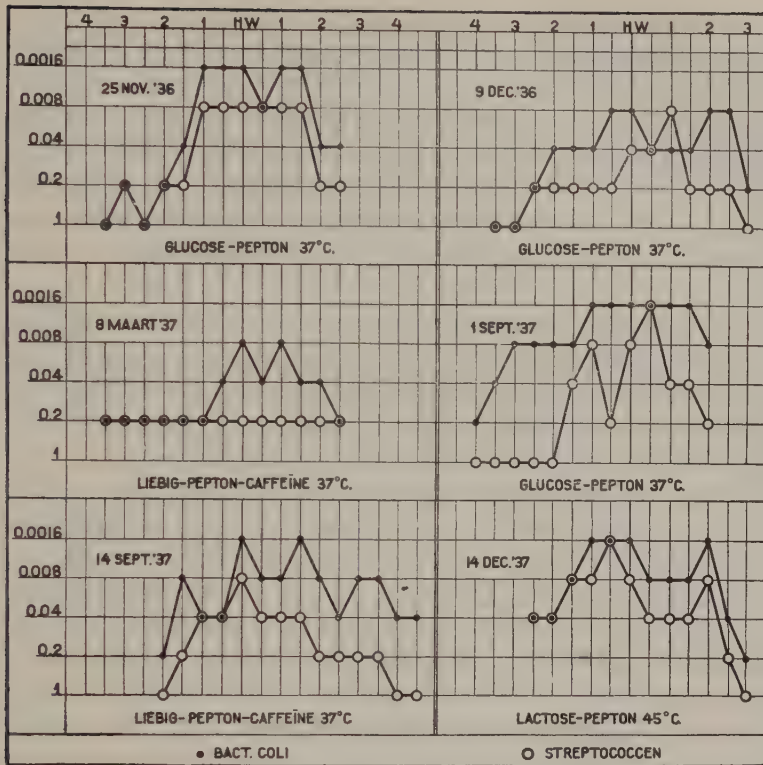
Met reïnculturen bleek, dat *Streptoc. lactis* en *Streptoc. mastitidis* niet in de cafeïne-pepton kunnen groeien. Ook indien men karnemelk, zelfs tot 1 cm³ toe, ent, volgt geen groei van streptococcen. Karnemelk toch wordt in de melkfabrieken, in de steden bereid uit ontroomde (of niet ontroomde) en daarna gepasteuriseerde melk, welke geënt wordt met een reïncultuur van *Streptoc. lactis*. Verontreinigt men de karnemelk echter met faeces, dan krijgt men terstond weer 10—20.000 streptococcen per toegevoegde milligram faeces.

In rauwe melk kon ik per cm³ $\pm$ 16.000 streptococcen aantoonen, zoowel met den vermelden pepton-lactose-voedingsbodem bij 45° C. als met den pepton-cafeïnebodem bij 37° C.

Uit de faeces van zoogdieren (paard, koe, varken, hond) krijgt men met den cafeïne-voedingsbodem naast de *Enteroc*-groep verschillende andere meer of minder gekleurde streptococcen (gele tot oranje), vooral uit de faeces van het paard.

Met de vermelde voedingsbodems (pepton-glucose 37° C.), pepton-cafeïne 37° C. en lactose-pepton 45° C. heb ik gedurende enkele jaren proeven genomen met Maaswatermonsters, genomen ter hoogte van het inneemkanaal der Waterleiding en wel gedurende eenige uren vóór tot eenige uren ná hoogwater (H.W.) om het half uur. Het alvalwater der stad (er heeft geen reiniging plaats) passeert bij opkomenden vloed het inneemkanaal van de bezinkbassins. Bij intredende eb onder wisselende weersomstandigheden (vooral de wind en afvoer der rivier hebben veel invloed) wordt het gemengde water eenige uren na hoogwater (gemiddeld $\pm$ 4 uren) geheel vervangen door afstroomend rivierwater, terwijl de verontreiniging eenige uren vóór hoogwater reeds begint, tevens werd de colititer der watermonsters bepaald en beide titers grafisch voorgesteld. Beide organismen zijn derhalve goede indicatoren voor faecale verontreiniging. Soms vallen coli- en streptococcentiter samen, meestal echter zijn er meer faecaal coli's.

Een bij het inneemkanaal geprojecteerd pompgebouw zal het in de naaste toekomst mogelijk maken alleen tijdens de laagste eb afstroomend rivierwater in de bezinkbassins te pompen en dus van een bacteriologisch zuiverder water uit te gaan. Thans nu de waterinname met den stand van het getij moet gebeuren, geschiedt dit met opkomend water, waarbij gezorgd wordt, tijdig de inlaat-sluizen te sluiten. In het water der bezinkbassins (in elk bassin bezinkt het slib uit het ingenomen water gedurende $\pm$ 10—12 uren) vindt men dan ook nooit zooveel streptococcen als in het Maaswater.



Den pepton-caffeïne-voedingsbodem, die als nadeel vertoonde het langzame groeien der streptococcen, kan men sterk verbeteren door er nog 0.1 % glucose aan toe te voegen; grootere concentraties (b.v. 0.3 %) zijn ongewenscht, daar dan weer coli te veel op den voorgrond kan komen. Men verbetert door die toevoeging van 0.1 % glucose ook de voorwaarden voor sommige sporenvormende bacteriën (*Bac. mesentericus*, *subtilis*, *mycoïdes*, *megatherium*), waardoor niet elk fleschje, dat troebel wordt na 2×24 uren streptococcen bevat. Microscopische controle is dus steeds noodig; de fleschjes met sporevormende bacteriën geven echter bij omschudden geen homogene troebeling, zooals die, welke streptococcen bevatten, doch veelal vlokjes en zijn hierdoor ook macroscopisch herkenbaar.

Met septic-tankvocht, rioolwater, faeces, faecaalverontreinigd water, verkrijgt men echter na 24 uren (of na 2×24 uren in de grootere verdunningen) practisch reinculturen van streptococcen, die microscopisch gemakkelijk herkenbaar zijn.

Boterzuurbacteriën in relatief groot aantal kunnen bij de pepton-lactose-ophooping bij 45 ° C. van streptococcen nog wel eens last veroorzaken, men kan dan met voordeel gebruik maken van den pepton-caffeïnevoedingsbodem met 0.1 % glucose. Den groei van sporevormende bacteriën heb ik in dezen voedingsbodem nog kunnen onderdrukken door zooveel natriumsulfiet Na_2SO_3 , toe te voegen in de fleschjes, dat de zuurstof weggenomen wordt. De cultuurvloei-stof wordt dan nog beter voor het ophoopen van faecale streptococcen.

Passen wij nu de besproken ophoopingsmethoden voor streptococcen toe op water in de verschillende reinigingsfasen van oppervlaktewater tot drinkwater, dan blijkt, dat men in het water der bezinkbassins nooit zooveel streptococcen vindt als in het Maaswater. Door de vóór- of snelfiltratie verdwijnen een zeker percentage streptococcen, ook het aantal colibacteriën neemt daarbij af, vooral in den tijd, dat deze ook chemisch-biologisch goed werkt (van ongeveer half Maart tot ongeveer half October). de meeste streptococcen en ook colibacteriën verdwijnen echter bij de langzame zandfiltratie en wel vooral bij biologisch ingewerkte filters. Het is derhalve niet alleen het affiltreeren of afsterven gedurende het filtratieproces.

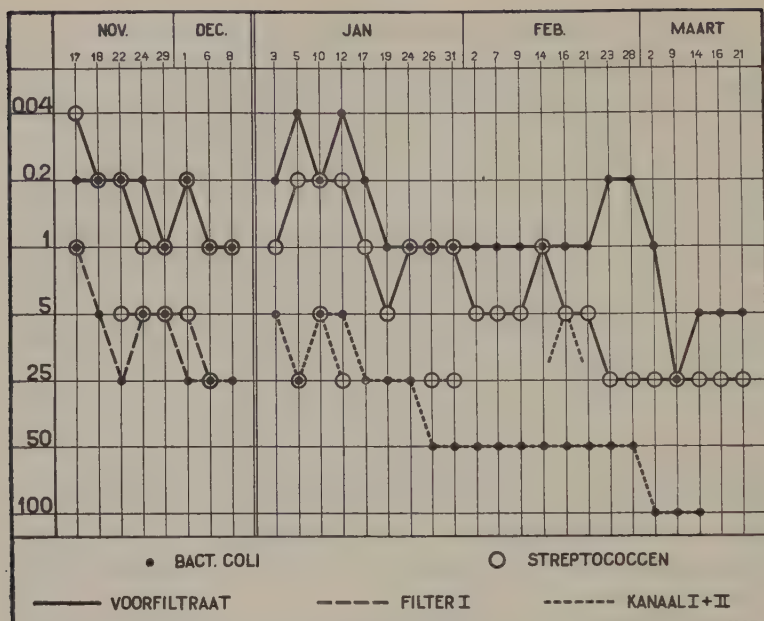
Een met nieuw zand gevuld zandfilter, wordt ter biologische rijping van het zandbed met water, dat de snelfilters gepasseerd en dus vóórgefiltreerd is, langzaam gevuld (om de lucht tusschen de zandkorrels gelegenheid te geven te ontwijken), daarna met zeer geringe filtratiesnelheid in werking gezet, terwijl het filtraat afgevoerd wordt naar het riool, zolang de bacteriologische reiniging onvoldoende is. Tusschen de zandkorrels hoopen zich dan detritusdeeltjes, levende en doode Diatomeeën, etc. op en tevens die bacteriesoorten, welke aangepast zijn aan de organische stoffen, die in het water voorkomen, d.w.z. deze kunnen oxydeeren. Deze soorten, vooral tot de geslachten *Micrococcus* en *Pseudomonas* behoorend, bevolken in hoofdzaak de bovenste lagen der zandbedden. Langzamerhand ontwikkelen zich hooger georganiseerde individuen, de Protozoën (Flagellaten, Ciliaten, etc.), Amoeben, enz. en begint het filter biologisch „rijp” te worden, d.w.z. nitrificatie treedt op, tijdens de filtratie nemen de organische stoffen af (KMnO_4 getal vermindert) het zuurstofgehalte en HCO_3 -iongehalte nemen af, het koolzuurgehalte toe, terwijl bacteriologisch het aantal op vleeschextract-gelatine en -agar kweekbare kiemen in het filtraat sterk vermin-

dert. In den winter duurt dit proces van „rijp” worden lang, in den zomer veel korter, hetgeen vóór de streptococceproeven reeds bekend was. Een pasgevuuld zandfilter, dat 20 November 1936 op infiltratie was gezet, leverde een filtraat, dat 15 December nog streptococce in 10, 25 en 50 cm³ water had, het opgebrachte vóórgefiltreerde water bevatte ze in 1 cm³. Na nogmaals 14 dagen kwamen streptococce alleen soms voor in 25 cm³ water. Ook bijgevuilde zandfilters geven in de wintermaanden een dergelijk beeld. In het voorjaar en in den zomer verdwijnen de streptococce veel sneller uit het gefiltreerde water van met nieuw zand gevulde filters. Een dergelijke filter op 11 April 1937 op infiltreren gezet, leverde na 5 dagen een filtraat, dat streptococce alleen in 25 cm³ water bevatte, op 19 en 21 April was de proef negatief in 50 cm³, op 23 April alleen nog positief in 100 cm³, op 3, 7, 10 en 12 Mei zelfs negatief in die hoeveelheid. Een ander filter gaf in April een analoog resultaat. Deze proeven werden in de laatste maanden van 1937 en in het begin van 1938 nog eens herhaald en hiervan een grafische voorstelling gemaakt.

De linkerzijde der grafiek geeft het infiltratiebeeld van een aangevuld zandfilter, rechts vindt men de grafische voorstelling van de streptococce- en colititer van het voorgefiltreerde water en van het gemengde reine water vóór de chloreering afgevoerd door de reinwaterkanalen I en II.

Uit de rechtsche grafiek blijkt, dat in het vóórgefiltreerde water in de maand Januari colibacteriën en streptococce voorkomen in $\frac{1}{5}$ — 1 cm³, in Februari coli meestal alleen in 1 cm³ (soms in $\frac{1}{5}$ cm³), streptococce in die maand echter alleen in 5 cm³ (op 14 Februari in 1 cm³) en in het laatst der maand en gedurende Maart is de kleinste hoeveelheid, waarin ze te vinden zijn, 25 cm³, coli in 5 cm³.

Een overeenkomstig beeld vertoont het reine water, wat de colibacteriën betreft. Streptococce zijn in het reine water viermaal aantoonbaar geweest, in 25 cm³ en tweemaal in 5 cm³. In Februari en Maart konden ze niet meer aangetoond worden in 50 tot 100 cm³ water. Merkwaardig is nu, dat de twee data, waarop ze in 5 cm³ water voorkwamen, juist dagen zijn, waarop er ijs in de filters lag en derhalve de temperatuur van het reine water zeer laag was ($\pm 2-3^{\circ}$ C.). Het is bekend, dat bij die temperatuur en omstandigheden (ijsbedekking, dus slechte aëratie) de biologische reiniging te wenschen overlaat.



Uit het bovenwater der filters heb ik vervolgens op analoge wijze als Louwe Kooymans in zijn dissertatie beschrijft, Protozoën gekweekt, welke streptococci en klaarblijkelijk ook coli snel opeten. Een streptococcenophoping in 25 en 50 cm³ voedingsvloeistof werd gecentrifugeerd en uitgewassen en toegevoegd aan een kolfje met bovenwater der filters en weggezet bij 20—22° C. Na 4—5 dagen was de oorspronkelijk sterk opalescente vloeistof nagenoeg helder geworden en waren talrijke Protozoën (Ciliaten, Flagellaten) en in het bezinksel op den bodem ook vele groote Amoeben zichtbaar. Zet men echter de Streptococcenemulsie met bovenwater der filter in de ijskast bij een temperatuur lager dan 2° C., dan gebeurt er niets, ja, men kan zelfs in een opgehelderde emulsie het proces stopzetten. Waarschijnlijk is dit de verklaring van het bovengenoemd verschijnsel der slechte biologische reiniging der filters bij lage watertemperatuur. Met een treffende regelmaat, doet zich nl. bij de bacteriologische controle van het filterbedrijf telken jare het verschijnsel voor, dat in begin Maart, bij het opleven der natuur, snel de coligrens en zooals uit dit onderzoek blijkt, in nog sterkere mate de streptococcengrens, naar grootere hoeveelheden water wordt verschoven. Klaarblijkelijk bevrijden aan het einde van den winter, de Protozoën, etc., zich snel uit hun cysten

en maken zich met groote snelheid van colibacteriën en streptococcen meester. In de bezinkbassins, waar het water tot rust komt, begint dit proces reeds; vele gegevens toonen nl. aan, dat ook het bezonken water in dien tijd een sterke verbetering ondergaat, vooral wat de Streptococcen betreft. In April en Mei konden verscheiden malen Streptococcen slechts in 25 cm³ bezonken water worden aangetoond. Verder volgt uit gegevens van vele onderzoekers, dat, waar colibacteriën en streptococcen in 50 en 100 cm³ water ontbreken, van eventueele pathogene bacteriën geen sprake kan zijn. Deze schijnen toch ten eerste veel sneller af te sterven en ten tweede de met voorliefde door de Protozoën te worden opgegeten.

Omgekeerd is het vinden van faecale streptococcen in een watermonster derhalve een aanwijzing van een *recente* faecale verontreiniging met alle consequenties van dien. Waarschijnlijk geldt dit echter alleen voor zoetwater, niet voor sterk brak of zout water en onder de omstandigheden van een waterleidingbedrijf met open, aan het zonlicht blootgestelde filters.

Engelsche onderzoekers, onder hen vooral Lt.-Col. C. H. H. Harold, Director of Water Examination, Metropolitan Water Board London, hechten aan het Streptococcononderzoek. In het jaarverslag 1936 (31th Report pg. 22), beveelt hij ter isolatie van Streptococcen aan het uitstrijken van positieve lactose Mac Conkeyproeven op platen lactoseagar 0.5 %, pepton 1 %, K₂HPO₄ 0.2 %, NaCl 0.5 %, waaraan in steriele oplossing is toegevoegd K-Telluriet 1 : 15000. Nog beter is volgens hem, bij de ophoopingsmethoden reeds direct van K-Telluriet gebruik te maken. Hij treedt bij de waardeering van streptococcononderzoek in de voetstappen van zijn voorganger, Dr. Houston, die reeds gedurende 35 jaren dit onderzoek verrichtte. Volgens een publicatie in het Journal of the American Water Works Association (1937, Vol. 29 No. 5 blz. 683—687) vindt Calvert, dat er tot nog toe in Amerika te weinig aandacht aan de streptococconproef is besteed, doch dat deze het echter wel waard is. Hier te lande wordt de streptococconproef sinds jaren door het Rijksbureau van Drinkwateronderzoek toegepast.

De literatuur over faecale Streptococcen is zeer uitgebreid. Hier moge volstaan worden met enkele meer recente publicaties voor bovenstaand onderzoek van belang.

L. H. Louwe Kooymans, Dissertatie, Amsterdam 1930.

J. M. Sherman and Pauline Stark, Journal of Bacteriology, Vol 22, pg. 275—285, 1931.

C. E. Safford, J. M. Sherman and H. M. Hodge, *Journal of Bacteriology*, Vol. 33, pg. 263—289, 1937.

J. M. Sherman, *Journal of Bacteriology*, Vol. 35, pg. 81—93, 1938.

C. K. Calvert, *Journal of the American Water Works Association*, Vol. 29, pg. 683—687, 1937.

W. Storck, *Zentralblatt f. Bakteriologie*, IIe Abt. Bd. 95, pg. 284—311, 1936.

H. u. O. Jensen, *Zentralblatt f. Bakteriologie*, IIe Abt. Bd. 96, pg. 110—138, 1937.

Folke Bang, *Zentralblatt f. Bakteriologie*, IIe Abt. Bd. 95, pg. 390—415, 1937.

Folke Bang, *Zentralblatt f. Bakteriologie*, IIe Abt. Bd. 95, pg. 449—468, 1937.

Short Abstract.

The disappearance of faecal Streptococci by filtration processes, applied by purifying surface-water (riverwater) to drinking water.

The recovery of faecal Streptococci in water (river-water), filtered water) was made by the following enrichment methods.

1.

Peptone (Poulenc) 1 %
Glucose 1 %
NaCl 0.5 %
Distilled Water
Temp. = 37° C.
lithmus, p_H = 7.0
In deep layer ($\pm$ 10 cm)
in test tubes

2.

Peptone (Poulenc) 1 %
Lactose 1 %
NaCl 0.5 %
Distilled Water
Temp. = 45° C.
lithmus, p_H = 7.0
In deep layer ($\pm$ cm)
in test tubes

3.

Peptone (Poulenc) 1 %
Caffeine 1 %
NaCl 0.5 %
Liebig's beefextr. 0.3 %
Distilled Water
pH = 7.0
Temp. = 37° C.
In wholly filled flasks.

4.

Peptone (Poulenc) 1 %
Caffeine 1 %
Glucose 0.1 %
NaCl 0.5 %
Liebig's beefextr. 0.3 %
Distilled Water
pH = 7.0
Temp. = 37° C.
In wholly filled flasks.

Discussion is made, why enrichment method 2 is better than method 1 and the former permits to determine the Streptococcititer of a watersample by microscopical examination after 20—24 hours. Enrichment method 3, which permits the same by microscopical examination after at least 2×24 hours, sometimes $3 \times$ and 4×24 hours in the greater dilutions, is much improved by the addition of 0.1 % glucose. After 30 hours, maximally 2×24 hours the Streptococci-titer is easily determined by microscopical examination on account of the large selectivity for faecal Streptococci of the culture liquid, which is still improved by the absorption of oxygen in the flasks by the addition of Na_2SO_3 . Streptococci (and so do coli) disappear by all filtration-processes, f. i. rapid-sandfiltration, but especially by slow sandfiltration. They are eaten and destroyed by Protozoa and Amoeba by preference in stagnant water. Especially in springtime the coli and streptococci-titer is improved, compared with wintertime. The improvement is graphically shown.

Low temperature (2°C.) seems to paralyse the activity of the Protozoa and Amoeba; in consequence if the surface of the water in the slow-sandfilter is covered with an ice-deck Streptococci may appear in the filtrate.

Een methode voor het tellen van levende bacteriën, vervanging voor de plaatmethode

DOOR

Dr. H. W. JULIUS.

(Uit het Hygiënisch Laboratorium der Rijksuniversiteit, Utrecht.)

De vraag, hoeveel levende bacteriën een of ander materiaal bevat, moet in het bacteriologisch laboratorium veelvuldig worden beantwoord. Men gaat daarbij van de gedachte uit, dat de afzonderlijke bacterie zich in geschikte omgeving tot een kolonie ontwikkelt; het aantal kolonies, dat zich na een bepaalde periode heeft gevormd, is een maat voor het aantal levende bacteriën, dat per volumeneenheid in het uitgangsmateriaal aanwezig was.

In hoeverre deze maat overeenstemt met de werkelijkheid zij geheel buiten beschouwing gelaten; het samen kleven van eenige bacteriën tot een klompje, waaruit maar één kolonie ontstaat, de mogelijkheid dat de voedingsbodem of de kweektemperatuur niet overeenstemt met de eischen, die de bacterie stelt, zijn slechts enkele moeilijkheden, die maken, dat het gevonden aantal niet meer is dan een afspiegeling van de werkelijkheid. Niettemin krijgt men op bedoelde wijze vergelijkbare en dus zeer bruikbare uitkomsten. In het experimenteele laboratorium kan het samenstellen van groeicurven of het bepalen van de snelheid waarmede bacteriën door antispetica worden vernietigd aanleiding zijn, dat de teltechniek wordt toegepast. Maar ook in het technische laboratorium komt de vraag voor bij onderzoek van water, melk, voedingsmiddelen, enz. enz. De werkwijze, die algemeen wordt toegepast, is de z.g. plaatmethode; zij is zóó bekend, dat ik mij van beschrijving geheel kan onthouden. Zij is zelfs in officiële voorschriften als standaardmethode erkend. Dat er nadeelen, wat betreft haar nauwkeurigheid, aan verbonden zijn, is evenzeer bekend. Doch een der voornaamste bezwaren tegen de plaatmethode heeft zich in het Hygiënisch Laboratorium te

Utrecht wel bijzonder laten voelen, toen het werk de eisch stelde, dat zéér groote series van quantitative bepalingen moesten worden gedaan. De bedoeling was n.l. om een aantal groeicurves, waarvan zeer veel punten bekend moesten zijn, te bepalen. Een platenproef van bv. 200 platen is dan een zware belasting voor een laboratorium, dat op deze groote aantallen niet is ingericht. Niet alleen dat in kort tijdsbestek vele platen noodig zijn, doch er is behoefte aan een groote hoeveelheid voedingsagar, aan veel meetpipetten, aan vele handen, die voor het gelijkmatig mengen zorgen, aan veel ruimte in de broedstoven, om van de groote hoeveelheid werk bij het tellen nog niet eens te spreken. De hinderlijke afmetingen, die een dergelijke proef aanneemt, zijn een groote rem voor snel en accuraat werken en men voelt zich sterk beperkt in de mogelijkheden dergelijke proeven te nemen. Bovendien onttrekt men ongewenscht veel werkkrachten aan andere in gang zijnde onderzoekingen.

De gedachte is reeds oud, om te trachten micromethoden voor het gestelde doel toe te passen. Wij herinneren slechts aan de slide-cell volgens Wright, de kleine plaatmethode volgens Forster enz. Zij hebben echter de nadeelen van de *micromethode*. Zij hebben alleen in speciale gevallen de voordeelen van de plaatmethode kunnen verdringen. Een ander idee, ook reeds toegepast, leek ons meer kans op succes te zullen geven: de rolcultuur. Door het „oprollen” van het agar-oppervlak bereikt men een aanmerkelijke besparing aan ruimte en ook aan materiaal. Het bleef echter de vraag hoe deze rolcultuur, die zich niet zoo erg eenvoudig laat vervaardigen, op groote schaal aan te wenden. Wij hebben daarbij gedacht aan kleine fleschjes in plaats van buizen; vlakke bodem en insnoering bij de hals maken een zuivere cylinder mogelijk. Voor het doel ideale fleschjes bleken goedkoop in den handel te zijn: zij worden o.a. gebruikt voor de verpakking van het protamine-zink-insuline¹⁾. Deze fleschjes nl. zijn zéér zuiver en regelmatig van vorm. Zij zijn vervaardigd van uitstekend glas en zij breken niet spoedig. De diameter verschilt bij de fleschjes onderling slechts weinig; de afsluiting (zie afb. 1 en 3) door middel van gummi kapje en bakeliten schroefsluiting voldoet goed. Door ze ondersteboven in een rek te

¹⁾ Zooals dit o.a. door de firma Organon in den handel wordt gebracht. Deze fleschjes zijn te verkrijgen bij de N.V. Organon te Oss. Indien de gummi dopjes versleten zijn, kunnen deze afzonderlijk worden geleverd.

plaatsen loopt het druppeltje synherese-vloeistof in het kapje. Verdamping wordt op doelmatige wijze tegengegaan.

Het oppervlak van het fleschje is $\pm 19 \text{ cm}^2$, dat van een plaat van 10 cm doorsnede is $\pm 78 \text{ cm}^2$. Het zeer weinig ruimte innemende fleschje is dus niet minder dan $\frac{1}{4}$ van een „normale” plaat; deze verhouding is alleszins bevredigend te noemen. Het is gebleken, dat een hoeveelheid van 2,5 à 2,8 cc voedingsagar juist de goede hoeveelheid is, om een agar-cylinder van doelmatige dikte te verkrijgen. Rekent men voor een normale plaat 20 à 25 cc agar, dan betekent het fleschje een besparing tot op $\frac{1}{8}$ à $\frac{1}{10}$ van de hoeveelheid voedingsbodem.

Waar het uitgangspunt was: besparing aan materiaal, tijd, maar bovenal arbeidskrachten, ligt het voor de hand, dat is gezocht naar een methode om de stolling mechanisch te doen verlopen. Tot mijn groote verbazing (dit zij eerlijkheidshalve gezegd!) moet het fleschje daarbij, natuurlijk in horizontale positie, met veel hogere snelheid om zijn as wentelen, dan ik verwachtte. Bij een draaisnelheid van 100 omwentelingen per minuut ontstaat een tonvormig vlak met groote onregelmatigheden, die zich vormen op het oogenblik, dat de agarmassa begint te stollen. Een omwentelingsgetal van ten minste 600, beter nog 800 à 1000 toeren per minuut, bleek eerst het gewenschte regelmatige cylinderoppervlak te waarborgen. Maar dit is dan ook zóó regelmatig en fraai, dat het met de plaat nauwelijks zoo is te bereiken. Het bleek zelfs ruimschoots de moeite waard hiervoor een toestel te construeeren; het vervangt minstens 50% zoo niet 75 % van de anders benoodigde werkkrachten.

Dit toestel is afgebeeld in afb. 2. Het bestaat uit een regelmatig loopende motor (doelmatig is een synchroom motor van niet te kleine capaciteit; een gramfoon-motor zal even goed kunnen voldoen), die met de noodige versnelling een aantal horizontale assen in beweging brengt tot een toerental van 800 à 1000 p. m. Door het zig-zag verloop van de snaar worden hier zes (het kunnen er ook meer zijn) assen tegelijk aangedreven. Daar zij zeer licht en zuiver moeten lopen, zijn zij gemonteerd in kogellagers. De bevestiging van de fleschjes geschiedt (nadat vele andere mogelijkheden waren overwogen) met behulp van metalen houders, zooals afgebeeld in afb. 3. De buitenste schroefmantel grijpt op de veerende lamellen, die tezamen een conus vormen. Door aanschroeven van dezen mantel, worden de lamellen samengedreven, waardoor het fleschje

rondom wordt gegrepen. De bodem wordt, altijd zuiver gecentreerd, gevangen in een conischen ring. Het fleschje met vloeibare agar wordt met één beweging in de houder bevestigd; hierna wordt de houder op de as geplaatst. Het is begrijpelijk, dat dit zóó moet geschieden, dat de reeds draaiende en stolling afwachtcnde fleschjes hiervan geen enkelen invloed ondervinden; anders zou hun oppervlak onregelmatig kunnen worden. Door de tonvormige pen van den houder te schuiven in den dop met veertjes, die op de as zit, wordt de houder met het fleschje zóó soepel op de draaiende as opgevangen, dat van onderlinge beïnvloeding niets merkbaar is. Op deze wijze kan men elk afgehandeld fleschje met vloeibare agar op het draaiende voertel plaatsen; als het laatste is aangebracht, is het eerste getoeld, zoodat men zonder onderbreking kan doorwerken. De ervaring leert, dat één analyste, zonder eenige hulp in een werkdag op deze wijze gemakkelijk 200 à 300 proefjes in kan zetten! Dit zou met de plaatmethode onmogelijk zijn, zelfs indien men mechanisch schudt. Immers onttrekt men de platen niet op het juiste oogenblik aan de schud-installatie, dan zijn zij bedorven. Om draaiend toetel behoeft, wat dat betreft, geen enkel toezicht!

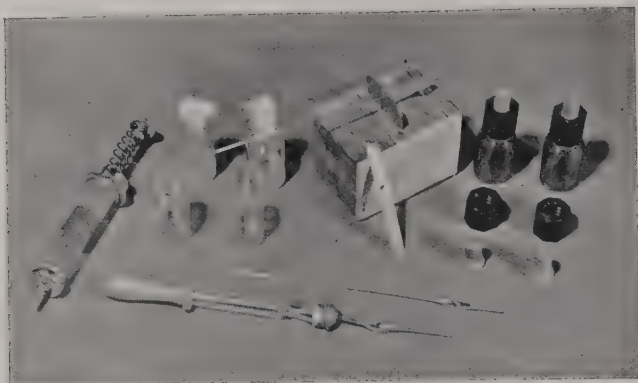
Op grond van de beschreven gegevens kan men nog verschillende voordeelen boeken: De fleschjes (zie verder afb. 1) kunnen van te voren worden gevuld met 2.7 cc agar-voedingsbodem. Men kan dit doelmatig doen met behulp van een 5 cc injectie-spuut, waarvan de zuiger door een opwaarts werkende veer wordt uitgetrokken. Met een stelschroefje op de zuiger-pen zijn verschillende volumina automatisch af te stellen. Het benodigde aantal fleschjes kan worden gevuld, van propjes worden voorzien en gesteriliseerd. Men heeft dus niet meer, zoo als bij de plaatmethode, steriele platen en vaten met gesmolten agar afzonderlijk nodig. Vlak voor het gebruik wordt de agar in de fleschjes door plaatsen in kokend water even opgesmolten. Na afkoelen tot $\pm 43^{\circ}$ C., wat bij deze hoeveelheid snel geschiedt, is zij klaar om beënt te worden.

Wanneer men 100 bepalingen in duplo doet, is men genoodzaakt 100 verieke meetpipeven te gebruiken. Aan dezen eisch, die even klemmend als zwaar is, hebben wij als volgt voldaan: Van hetzelfde glas, als dient voor het vervaardigen van pipetten volgens Pasteur, worden telkens capillairen zóó uitgetrokken, dat in het midden een bolletje op oorspronkelijke dikte overblijft. Dit kost $\pm 1\frac{1}{2}$ cm glas.

De opening van deze pipetten wordt nu „genormaliseerd” zoodanig, dat de *uitwendige* diameter (die de druppelgrootte bepaalt!) van alle pipetjes even groot is. Dit geschiedt door een der uiteinden in een gleuf van een metalen plaatje te schuiven tot het juist vast klemt (afb. 1). Met een glasviltje wordt een krasje gegeven en het pipetje wordt zuiver afgebroken. Daarna wordt het door flambeeren gesteriliseerd en in een petrischaal bewaard tot gebruik. Dan wordt het dicht gesmolten uiteinde afgebroken en gestoken in een gummi-kapje met een klein gaatje, dat op een gewone glasbuis met speentje is bevestigd. Een vernauwing in de glasbuis behoedt het kleine pipetje voor trillen en slingeren. Bij meten is gebleken, dat de druppels (water) van een groot aantal pipetjes gemiddeld 28 mgr. wegen met een strooiing van 30 tot 26 mgr. Dit is alleszins bevredigend te noemen. Het is nu in het geheel geen bezwaar voor elke bepaling een steriel pipetje te nemen, dat na afloop wordt weggeworpen. Een leerjongen vervaardigt gemakkelijk een honderdtal van deze pipetjes in 1 à 1½ uur.

Is de agar in de flechjes opgesmolten en tot juiste temperatuur afgekoeld, dan voegt men 1 tot 5 druppels uit het gestandaardiseerde pipetje toe, sluit het fleschje met gummidopje en schroefsluiting en zet het in het draaiende toestel. Na 3 tot 5 minuten kan het er af worden genomen en ondersteboven in een rek in de broedstoof worden geplaatst. De gummidopjes worden afzonderlijk gesteriliseerd (bv. in een groot bekerglas met glazen deksel in de autoclaaf.) De bakeliten dopjes behoeven niet te worden gesteriliseerd; zij komen niet met geïnfecteerd materiaal in aanraking. Is dit onverhoopt toch het geval, dan kan men ze het best *afzonderlijk* hetzij uitkoken, hetzij in de autoclaaf ontsmetten. Daar zij van een phenol-condensatie-product zijn vervaardigd, verleenen zij kookwater en stoom antiseptische eigenschappen, die zich aan rubber of voedingsbodem mede kunnen deelen. In den aanvang was dit oorzaak van allerlei onbegrepen onregelmatigheden.

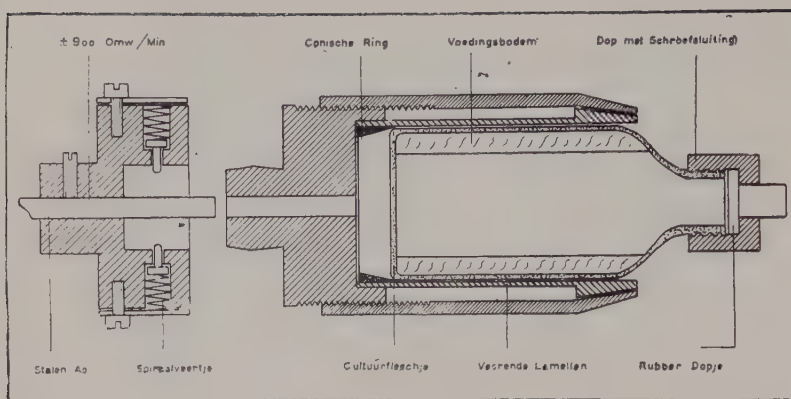
Het regelmatige fleschje met zijn fraaie binnenbekleding van agar verschaftte ons nog een groot voordeel bij het tellen. In afb. 4 is het tel-toestel afgebeeld. Een as, voorzien van schroefdraad, vindt geleide in een lang blok met inwendige schroefdraad. De kop van de as omklemt een bakeliten schroefdopje. Door de eigen sluiting van het fleschje te verwijderen en dit in de schroefdop op de



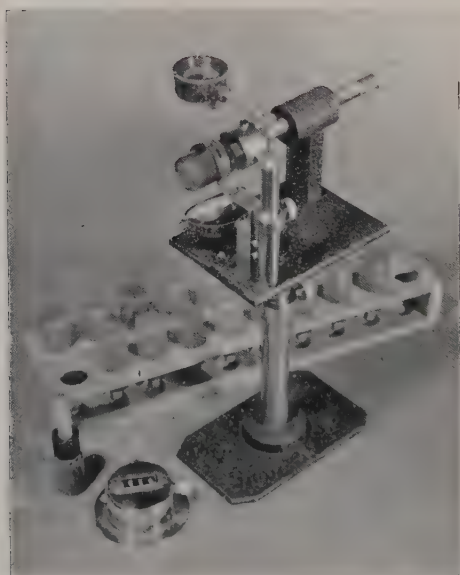
Afb. 1.



Afb. 2.



Afb. 3.



Afb. 4.

as te bevestigen, vormt het fleschje één geheel met de schroefas. Het kan nu spiraalsgewijs axiaal draaiend worden voortbewogen. Boven het fleschje is een spleet geplaatst met een zuivere begrenzing en juist even breed als de spoed van de schroefdraad op de as. Boven de spleet bevindt zich een loupe en door eenvoudig iedere kolonie, die de dwarse eindstreep van de spleet passeert, op een telklok te registreeren, krijgt men al draaiend en tikkend het aantal kolonies, zonder dat zich iets voordoet van het afmattende van het tellen. Desoriënteering of „in de war” raken is uitgesloten; men *kan* nooit twee keer op dezelfde plaats terugkomen! Doordat het veldje, waarin geteld wordt, uitermate klein is, blijkt het mogelijk 500 à 1000 kolonies in één fleschje te tellen, zonder iets aan nauwkeurigheid te verliezen. Het is bekend, dat getallen boven de 200 à 300 in de plaat het tellen bijna onmogelijk maken. Verder liggen de kolonies door het intensieve roeren zóó regelmatig, dat de getallen van elke volgende omwenteling zéér fraai overeenstemmen. Hierdoor mag men een klein aantal omwentelingen tellen, bepalen hoeveel omwentelingen een geheel fleschje beslaan en door vermenigvuldiging het aantal kolonies berekenen. Zoo is met bevredigende nauwkeurigheid nog een aantal van 2.000 à 8.000 kolonies in één fleschje te bepalen. Dit zijn aantallen, die in de plaat volkomen onbruikbaar zijn. Als voordeel hebben wij dus ook nog ervaren, dat een aanmerkelijke mis-schatting in het aantal bacteriën, doordat het materiaal niet voldoende verdund was, veel minder stoort, dan bij de plaatmethode het geval is.

Samenvattend kunnen wij zeggen, dat de beschreven methode ons in staat stelt om in weinig tijd, met weinig materiaal, en met aanmerkelijk minder arbeidskrachten, veel tellingen uit te voeren. De besparing in tijd is zeker meer dan $\pm 50\%$. In arbeidskrachten $\pm 75\%$, in materiaal 80% à 90% . In groote series proeven blijkt, dat de werkkrachten gaarne met de methode werken. Zij verloopt vlot en is véél minder inspannend dan de plaatmethode. Wat de kosten betreft: De aanschaf van apparatuur met 500 fleschjes is ongeveer even hoog als van 500 Petri-schalen van 10 cm t.w. $\pm 500 \times 35 \text{ cent} = f 175^1$ (zonder motor). De aanschaffingskosten

3) Metaalwarenfabriek Emba. N.V., Gijsbrecht van Amstelstraat 16, Amsterdam (Oost) vervaardigt de toestellen en levert alle benodigdheden. (Octrooi aangevraagd).

worden dus zeer snel goed gemaakt, wanneer men eenig telwerk van beteekenis te doen heeft. Voor accidenteele bepalingen blijve de plaatmethode haar plaats behouden.

Tenslotte zij nog opgemerkt, dat de fleschjes, ook als er bloed-agar in is gebracht, zich zeer goed laten reinigen met het mengsel van Gilmore: ¹⁾

	waterhoudend	watervrij	watergehalte
Na-Hexametaphosphaat	40	48	—
Trinatrium fosphaat	15	18	1 H ₂ O
Na-metasilicaat	40	28	5 H ₂ O
Na-Hydroxyde	5	6	—

Hierin koken en daarna uitspoelen is voldoende.

Een uitgebreide onderlinge vergelijking van de „gewone” plaatmethode, de fleschjes-methode, de slide-cell en de „kleine plaatmethode” volgens Forster is in voorbereiding. Groeicurven gemaakt met behulp van de beschreven techniek zullen in een publicatie elders verschijnen.

¹⁾ De Onderl. Pharmac. Groothandel te Utrecht kan het hierin voorkomende Natrium hexametaphosphaat leveren onder den naam *Calgon*.

(Juli 1938).

Over het gebruik van glutaminezuur in een synthetische voedingsbodem bij het biochemisch onderzoek van pathogene darmbacteriën en over phenolrood als indicator in de lactose-agarplaat

DOOR

H. BEEUWKES en F. A. BANNINK.

Voor de diagnose van pathogene darmbacteriën is de z.g. „bon-te reeks” een onontbeerlijk hulpmiddel. Meestal wordt bouillon als voedingsmedium gekozen. Door toevoeging van een aantal suikers en lakmoes als indicator is men in staat de biochemische werkzaamheid van bacteriën te onderzoeken. Hoewel bouillon uitstekende groeivoorwaarden schept, is toch de samenstelling niet steeds gelijk.

Lakmoes voldoet niet aan de eischen, die men aan een goede indicator stellen mag. De kleurveranderingen zijn niet voldoende duidelijk. In buizen, waarin de suikers niet aangetast worden, blijft de kleur niet constant. Bovendien kunnen bacteriën met reduceerende eigenschappen de voedingsbodem kleurloos maken.

Voor een nauwkeurige biochemische differentiatie is een voedingsbodem van constante samenstelling en een gevoelige indicator een vereischte. Bovendien moeten de verschillende bestanddeelen goedkoop zijn.

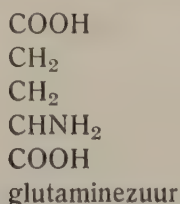
Wij hebben gemeend in glutaminezuur en NH_4 lactaat stoffen gevonden te hebben, die aan deze eischen voldoen.

Glutaminezuur is een chemisch zuivere, eenvoudige en goedkope stikstofverbinding. *W. Kaufmann* en *Jan Smit* raadden deze stof aan ter vervanging van pepton in voedingsbodems voor het bacteriologisch wateronderzoek. *F. Folpmers* vergeleek glutaminezuur en pepton (Witte) bij de proef van Eykman met oppervlakte water. Glutaminezuur in combinatie met NH_4 lactaat gaf betere resultaten dan pepton (Witte) als stikstofbron. Colibacteriën

groeien uitstekend in een dergelijk milieu. Het melkzuur uit het NH_4 lactaat kan door coli-achtige organismen goed geassimileerd worden, terwijl de NH_4 groep stikstof kan leveren.

In navolging van *Folpmers* gebruikten wij 1 % d-glutaminezuur en 1 % ammoniumlactaat. Als indicator werd gekozen phenolrood (phenolsulphonphtaleïne). Deze stof bezit een omslagtraject van p_H 6.8—8.4. Bij een p_H 7.8 heeft de voedingsbodem bij aanwezigheid van phenolrood, een paars-roode kleur.

De chemische formule van glutaminezuur ziet er als volgt uit:



De synthetische voedingsbodem, zooals wij hem gebruiken, heeft de volgende samenstelling en bereidingswijze:

In 1000 cc aq. dest. wordt opgelost:

1 % glutaminezuur.

1 % ammoniumlactaat.

$\frac{1}{2}$ % sec. kalium fosphaat.

$\frac{1}{2}$ % keukenzout.

De zuurgraad van dit mengsel bedraagt ± 4.1 .

Vervolgens wordt de zuurgraad van den voedingsbodem gebracht tot p_H 8.2 door toevoeging van 4N NaOH en 20 cc 0.02 % phenolroodoplossing toegevoegd. Nu wordt dit mengsel 5 minuten bij 104°C . gesteriliseerd. Door de p_H van de glutaminezuurvoedingsbodem, waarin zich geen indicator bevond, voor en na sterilisatie te onderzoeken, kwam vast te staan, dat de zuurgraad 0.4 daalde. Daarom werd uitgegaan van een p_H 8.2, zoodat de voedingsbodem een eindzuurgraad van 7.8 bezat.

Voor het biochemisch onderzoek gebruikten wij vijf suikers. Deze koolhydraten worden voor de sterilisatie bij de glutaminezuurvoedingsbodem gevoegd, b.v. op de volgende wijze:

1 Liter van het glutaminezuur mengsel, met een p_H 8.2 wordt in 5 porties van 200 cc verdeeld.

Bij elke hoeveelheid van 200 cc wordt resp. 3 % saccharose, 3 % maltose, 3 % manniet, 1 % lactose en 1 % glucose gebracht,

de zuurgraad wederom bepaald en 20 cc 0.02 % phenolroodoplossing toegevoegd. Van de verschillende suikeroplossingen wordt 5 cc in buizen gepipetteerd en deze vervolgens gesteriliseerd, door een verhitting van 5 minuten bij 104° C.

De zuurgraad na deze sterilisatie daalt van 0.4 tot 0.6 voor de verschillende suikeroplossingen, zoodat tenslotte een p_H van 7.6 à 7.8 resulteert, wanneer men uitgaat van een synthetische voedingsbodem met een p_H 8.2.

De vloeistof in de buizen heeft een paars roode kleur en is volkomen helder. Ook het glutaminezuur en het ammoniumlactaat ondergaan een verandering van de zuurgraad van ± 0.4 na sterilisatie.

In de volgende tabel staat de verandering van de zuurgraad na de sterilisatie van de verschillende suikeroplossingen en onderdeelen van den voedingsbodem weergegeven.

	pH voor sterilisatie	pH na sterilisatie 5 min. bij 104° C.
synthetische voedingsbodem + saccharose.....	8.21	7.6
„ „ + maltose.....	8.70	8.38
„ „ + manniet.....	8.21	7.81
„ „ + lactose.....	8.3	7.68
„ „ + glucose.....	8.17	7.73
1 % glutaminezuuroplossing.....	9.04	8.63
1 % ammoniumlactaatoplossing.....	8.67	8.37
synthetische voedingsbodem.....	8.27	7.85

Het blijkt, dat de voedingsbodem, gecombineerd met saccharose en lactose, 0.6 terugloopen, terwijl alle overige oplossingen een verandering van 0.4 vertoonen. Alle p_H metingen werden verricht volgens de colorimetrische methode met het toestel van *Duboscq*.

De verandering van de p_H na sterilisatie is in de bacteriologie algemeen bekend. *Heicken* toonde aan, dat sterilisatie in stroomende waterdamp den geringsten invloed heeft op de zuurgraad. Verhitting in de autoclaaf, vooral bij hogere temperaturen, liet een duidelijken teruggang zien. Ook trad verandering van de zuurgraad op wanneer hij de bouillon eenigen tijd liet staan. Zwakzure bouillon bleef constant, zwak alcalische vertoonde een geringe verandering, terwijl sterker alcalische bouillon zeer duidelijk terugliep.

Door koolzuur absorbtie uit de lucht waren deze veranderingen in de p_H te verklaren. Hoe alcalischer de bouillon, hoe meer koolzuur gebonden werd. Ook bij lang bewaren van den glutaminezuurvoedingsbodem wordt deze zuurder, hetgeen kenbaar is aan de oranje kleur. Het is daarom beter de verschillende koolhydraatoplossingen te bewaren in flesschen afgesloten met een gummistop.

Kleinere hoeveelheden, langen tijd in reageerbuizen bewaard, vertoonen een duidelijke verandering van de p_H . Uit de kleuren van de vloeistoffen kan men gemakkelijk bij benadering de zuurgraad te weten komen. Bij een p_H 7.8 is de kleur van den voedingsbodem paars-rood. Bij zuurder worden van de vloeistof verandert deze tint van rood via oranje in geel-oranje om bij een p_H 6.6 duidelijk geel te worden.

Een aantal darmbacteriën werden nu geënt in de glutaminezuurvoedingsbodem met de verschillende koolhydraten. Gelijktijdig werd vergeleken de suikeraantasting in bouillon Martin met lakmoes als indicator, zooals in de volgende tabel te zien is.

Aantasting van koolhydraten verraadt zich in de glutaminezuurvoedingsbodem door een verandering van de roode kleur in geel. In lakmoesbouillon van blauw in rood. In de buizen met glucose en lactose bevond zich een gasbuisje.

In iedere buis werd met een pipet van Pasteur 1 druppel van een 24 uur oude bouilloncultuur geënt en deze vervolgens 24 uur bebroed bij 36.5°C .

Het blijkt, dat wanneer bacteriën een bepaald koolhydraat aantasten, er steeds een zeer duidelijke kleuromslag optreedt, kenbaar aan de intens gele kleur van den voedingsbodem. In de buizen, waarin geen suiker gesplitst wordt, blijft de roode kleur bestaan en er is zodoende een uitstekend contrast waar te nemen.

De groei van de meeste darmbacteriën is minder intensief dan in bouillon. Een uitzondering maken hierop Gärtner, Coli en Aërobacter. Deze bacteriën groeien bijna even welig.

Zoodra een koolhydraat wordt gesplitst in den glutaminezuurvoedingsbodem, blijkt de troebelheid van de voedingsvloeistof veel sterker te worden. Enkele paratyphusstammen, die in bouillon weinig gas uit glucose vormden, waren negatief in glucose-glutaminezuur. De gele kleur echter toonde aan, dat glucose aangetast was. Zwakke gasvormers zal men daardoor misschien voorbij zien. Een uitgebreid routine-onderzoek moet hierop het antwoord geven.

Worden uit de glucose en lactosebuizen de gasbuizen weg-

GLUTAMINEZUUR VOEDINGSBODEM.

Stam	saccharose	maltose	manniet	lactose	glucose
Shiga 149.....	rood	rose	rose	g.g. rood	g.g. geel
Shiga 48.....	"	rood	oranje	" "	" "
Shiga 15.....	"	rose	rose	" "	" "
Flexner 146.....	"	geel	geel	" "	" "
Flexner 140.....	"	"	"	" "	" "
Sonne 1.....	"	"	"	" "	" "
Sonne 2.....	"	"	"	" "	" "
Paratyphus A. 215.....	"	"	"	" "	gas "
Paratyphus A. 82.....	"	"	"	" "	" "
Paratyphus B. 87.....	"	"	"	" "	" "
Paratyphus B. 86.....	"	"	"	" "	" "
Paratyphus B. 194.....	"	"	"	" "	" "
Paratyphus C. 154.....	"	"	"	" "	" "
Suipestifer 224.....	"	"	"	" "	" "
Typhus 161.....	"	"	"	" "	g.g. "
Typhus 160.....	"	"	"	" "	" "
Typhus H. 901.....	"	"	"	" "	" "
Gärtner 204.....	"	"	"	" "	gas "
Coli 157.....	"	"	"	gas geel	" "
Coli 158.....	geel	"	"	gas geel	" "
Faecalis 61.....	rood	rood	rood	g.g. rood	g.g. rood
Aërobacter 241.....	geel	geel	geel	gas geel	gas geel
Bang 237.....	rood	rood	rood	g.g. rood	g.g. rood

g.g. = geen gas.

gelaten en voegt men om de gasvorming te onderzoeken, lactose en glucosebouillon met een gasbuis, aan de bonte reeks toe, dan is hiermede het bezwaar ondervangen. Het viel ons echter op, dat enkele paratyphusstammen ook in lactose een spoortje gas vormden.

Deze gasvorming is te verklaren door splitsing van glucose, aanwezig in de lactose. Deze laatste suiker is moeilijk geheel zuiver te verkrijgen.

De volgende tabel laat de aantasting van koolhydraten door de verschillende stammen zien in lakmoes-bouillon, zooals deze in de gewone bonte reeks aangewend wordt. Lakmoes werd toegevoegd aan saccharose, maltose en manniet, terwijl in glucose en lactose zich een gasbuisje bevond.

Wordt deze tabel vergeleken met de vorige, dan blijkt, dat verschillende stammen, o.a. Flexner 140, Sonne I, Sonne 2, Paratyphus B 86, Typhus 161, Typhus H. 901 en Shiga 18 saccharose in bouillon splitsen, terwijl dezelfde stammen deze suiker in

BOUILLON.

Stam	Saccha- rose	maltose	man- niet	lactose	glucose
Shiga 149.....	paars	paars	paars	g.g.	g.g.
Shiga 148.....	rood	rood	rood	"	"
Shiga 15.....	blauw	blauw	blauw	"	"
Flexner 146.....	paars	rood	rood	"	"
Flexner 140.....	rood	rood	rood	"	"
Sonne 1.....	rood	rood	rood	"	"
Sonne 2.....	rood	rood	rood	"	"
Paratyphus A. 215.....	paars	rood	rood	sp. gas	gas
Paratyphus A. 82.....	grijs	grijs	rose	g.g.	gas
	paars	geel	geel		
Paratyphus B. 86.....	rood	rood	rood	"	gas
Paratyphus B. 194.....	reduc- tie	reduc- tie	rood	"	gas
Paratyphus 1. 154.....	paars	bleek rose	rose	"	gas
Suipestifer 224.....	paars	rood	rood	sp. gas	gas
Typhus 161.....	licht rood	rood	rood	g.g.	g.g.
Typhus 160.....	paars	rood	rood	"	g.g.
Typhus H. 901.....	rood	rood	rood	"	g.g.
Gärtner 204.....	reduc- tie	rose	rose	"	gas
Coli 157.....	reduc- tie	reduc- tie	rood	gas	gas
Coli 158.....	oranje	rood	rood	gas	gas
Faecalis 61.....	blauw	blauw	blauw	g.g.	g.g.
Aërobacter 241.....	reduc- tie	reduc- tie	reduc- tie	gas	gas
Bang 237.....	paars	paars	paars	g.g.	g.g.

g.g. = geen gas.

sp.g. = spoor gas.

den glutaminezuurvoedingsbodem onaangetast laten. Paratyphus A 125 en Suipestifer 224 vormden tevens een weinig gas in lactose bouillon.

Enkele stammen reduceerden lakmoes.

In den synthetischen voedingsbodem verraadt zich de splitsing van koolhydraten veel scherper dan in lakmoesbouillon. Bovendien wordt de indicator niet gereduceerd door bacteriën, die deze eigenschap bezitten. De glutaminezuurvoedingsbodem schept voldoende gunstige groei-voorwaarden voor pathogene darmbacteriën, hoewel de gasvorming minder krachtig is; twee buizen met lactose- en glucosebouillon en een gasbuisje aan de bonte reeks toegevoegd, heffen dit bezwaar op.

Aangemoedigd door deze resultaten hebben wij de waarde onderzocht van een lactose-agarplaat, waarin zich phenolrood als indicator bevond.

Voor de isolatie van pathogene darmbacteriën is de voedingsbodem van Endo een algemeen bekende en gebruikte plaat. Hoewel uitstekende resultaten hiermede te verkrijgen zijn, kleven toch eenige bezwaren aan dezen voedingsbodem. De Endo-agar is niet lang te bewaren en wordt spoedig rood. Bovendien kunnen geringe fouten bij de bereiding van de Endoplaat deze doen mislukken.

De phenolroodplaten zijn uiterst eenvoudig te bereiden en deze vaste voedingsbodem, bewaard in wijdmondsche flesschen, afgesloten met een gummistop, blijft zeer lang goed. Phenolrood-agarplaten kunnen bovendien eenige dagen bewaard worden zonder in kleur te veranderen.

De platen worden op de volgende wijze samengesteld:

Aan 3 % opgesmolten bouillonagar wordt 1 % lactose toegevoegd; de agar vervolgens tot een p_H 7.8 gebracht en 10 % 0.02 % phenolroodoplossing als indicator erbij gebracht. De roodgekleurde agar wordt nu 10 minuten bij $104^\circ C$. gesteriliseerd. De zuurgraad blijft constant na deze verhitting.

Platen werden gegoten van de phenolroodagar en beënt met een suspensie, bestaande uit coli en typhusbacteriën. Na 24 uur bebroeden bij $36.5^\circ C$. zien afzonderlijke coli-koloniën er geel en ondoorzichtig uit. Om de koloniën zijn gele hoven als gevolg van de lactosesplitsing waar te nemen, waarvan de gele kleur gelijkmatig in het rood van de phenolroodagarplaat overgaat. Colibacteriën zijn hierdoor gemakkelijk te herkennen. Typhusbacteriën groeien met heldere, rose koloniën op de rood gekleurde agar. Ook andere pathogene darmbacteriën, zooals Flexner, Shiga, Y, Sonne, Paratyphus A, Paratyphus B, Parathyphus C, groeien uitstekend met heldere, rose koloniën op deze phenolroodagarplaten. De verdachte koloniën zijn steeds zonder moeite van B. coli, Aërobacter, B. Proteus en occen te onderscheiden. Het ontbrak ons aan de gelegenheid deze platen aan een groot materiaal te toetsen.

SAMENVATTING.

- 1°. Beschreven wordt een synthetische voedingsbodem, bestaande uit glutaminezuur en ammoniumlactaat, met

phenolrood als indicator, voor het biochemisch onderzoek van pathogene darmbacteriën.

- 2°. De onderzochte micro-organismen vertoonen een goeden groei in dit medium; aantasting van een koolhydraat kenmerkt zich door zeer duidelijke kleursveranderingen van de voedingsvloeistof.

De gasvorming blijkt minder intensief dan in bouillon Martin.

- 3°. Inplaats van Endoplaten voor isolatie van pathogene darmbacteriën wordt een lactose-agarplaat met phenolrood als indicator beschreven. De eenvoudige bereidingswijze, de lange houdbaarheid en goede differentiatie van koloniën van apathogene en pathogene darmbacteriën zijn kenmerken van dezen vasten voedingsbodem.

L I T E R A T U U R.

- K. Heicken.* Ueber die Veränderung der Wasserstoffionen konzentration von unbeimpfter Nährbouillon beim Sterilisieren und Lagern. Zentralblatt für Bakteriologie. Bd. 135, 1935, s. 513.
- F. Folmpers.* Vergelijkende resultaten verkregen door vervanging van pepton (witte) door glutaminezuur als stikstofbron bij de Eykmanproef. Ant. van Leeuwenhoek. Ned. Tijdschr. v. Hyg., Microbiol. en Serologie. 1935. blz. 343.
- W. Kauffman en Jan Smit.* Over het gebruik van d-glutaminezuur bij het bacteriologisch wateronderzoek. Ant. v. Leeuwenhoek. Ned. Tijdschr. v. Hyg., Microbiol. en Serologie. 1935. blz. 334.
-

Glucose-dissimilatie door *Vibrio cholerae* en *Vibrio El Tor*

DOOR

Dr. J. K. BAARS.

Wanneer wij de literatuur betreffende de biochemische eigenschappen van *V. cholerae* en *V. El Tor* doorlezen, trekt het de aandacht, dat wel over den aard der verbindingen, welke geschikt zijn om als substraat voor deze vibrionen te dienen, uitgebreide onderzoekingen zijn gepubliceerd^{1) 2)}, doch dat over den aard der hieruit gevormde stofwisselingsproducten zeer weinig bekend is.

*Kolle*³⁾, vermeldt dat de vibrionen l.-melkzuur zouden vormen benevens aldehyd. Ook *Lehmann* en *Neumann*⁴⁾ noemen het l.-melkzuur en geven tevens aan, dat geen zichtbaar gas wordt gevormd.

In het Engelsche werk: *A system of bacteriology in relation to medicine*⁵⁾, wordt eveneens vermeld dat glucose en andere koolhydraten vergist worden zonder gasproductie, evenals in *Topley* en *Wilson*⁶⁾. Deze vermelden verder nog dat lakmoesmelk gewoonlijk verzuurd en gestremd wordt. Ook de choleraroodreactie, welke slechts berust op het vormen van splitsingsproducten uit pepton (welke dan later met geconc. zwavelzuur de roode kleur geven, een allerminst voor cholera vibrionen specifieke reactie)

¹⁾ *Börge Heiberg*: On the classification of *Vibrio cholerae* and the cholera like vibrios, 1935.

²⁾ *K. Nobechi*: J. of Bact. 10, 197 (1925).

³⁾ *W. Kolle, R. Kraus und O. Uhlenhuth*: Handb. d. path. Mikro-organismen, Bd. I. dl. 1 pg. 178 (1929).

⁴⁾ *K. B. Lehman & R. O. Neumann*: Bakteriologische Diagnostik 7e Aufl. (1927) Bd. II, pg. 532.

⁵⁾ *A system of bacteriology in relation to medicine*. Vol. IV. pg. 343. Uitgegeven door de Medical Research Council 1929.

⁶⁾ *W. W. C. Topley and G. S. Wilson*: The principles of bacteriology and immunology. 2nd ed. 1936, pg. 387.

wordt genoemd. Tenslotte vermelden zij nog de indolvorming, reductie van nitraat tot nitriet en eventueel verder. Ook methyleenblauw zou soms gereduceerd kunnen worden, terwijl zwavelwaterstofproductie wel voorkomt.

Nobechi l.c. vermeldt nog dat uit de koolhydraten zóó veel zuur wordt gevormd, dat een ongebufferde cultuurvloeistof na 2 à 3 dagen steriel geworden zou zijn.

In tegenstelling met de bovenvermelde mededeelingen over het niet vormen van gas (koolzuur) staan de onderzoeken van *Linton, Mitro en Mullick*¹⁾ over het verband tusschen koolzuurproductie en glycolyse door vibrionen van de verschillende „Heiberg” groepen. Uit deze onderzoeken blijkt overtuigend, dat wel degelijk aanmerkelijke hoeveelheden koolzuur kunnen worden gevormd bij glucosedissimilatie.

Tenslotte zij nog vermeld, dat door *Taylor*²⁾ het voorkomen van acetylmethylcarbinol in vibrionen-cultures werd nagegaan. Hij verkreeg talrijke positieve resultaten met vibrionen van de verschillende Heiberg-groepen³⁾ en in verband met een loopend onderzoek in dit laboratorium werd hier voor bij een 176-tal echte *V. cholerae* en *V. El Tor*-stammen eveneens het carbinolvormend vermogen onderzocht, waarbij bleek dat bij nagenoeg alle *V. cholerae*-stammen de Voges-Proskauer reactie negatief was, terwijl deze bij *V. El Tor* gewoonlijk positief is. (Van de 105 *V. cholerae* stammen gaven er 103 een negatieve *V. P.*-reactie. Voor de gedetailleerde resultaten zij verwezen naar de desbetreffende publicatie).

Het feit, dat het acetylmethylcarbinol bij *V. cholerae* *niet* en bij *V. El Tor* in het algemeen *wel* voorkomt, wijst op een zoodanig verschil in de stofwisseling dezer beide vibrionensoorten, dat het

¹⁾ *R. W. Linton, B. N. Mitra and D. N. Mullick: Ind. J. of Med. Res.* 23, 589 (1936) en 24, 317 (1936).

²⁾ *J. Taylor: Report of the Scientific Advisory Board (Indian) Research Found. Assoc.)* 1936 pg 36.

³⁾ Hieronder verstaan wij vibrionen van de Heiberg groep No. 1, die allen dus de volgende eigenschappen hebben: Vorming van zuur in glucose, manniet, maltose, saccharose en mannose; geen zuur in lactose en arabinose, indolproductie +, cholerarood reactie +. Serologisch komen ze overeen met de O-sub groep van Gardner en Venkatraman; ze reageeren n.l. tot de titergrens met O-antiserum Inaba of Ogawa, bereid met antigeen vlg. Bruce-White. Het nadere onderscheid in *V. cholerae* en *V. El Tor* wordt gemaakt op grond van het feit, dat *V. cholerae* geitenbloed-bouillon *niet* haemolyseert en *V. El Tor* wel (binnen 24 uur).

niet uitgesloten leek ook nog andere biochemische verschilpunten dan de V. P.-reactie op te kunnen sporen, welke behalve de haemolytische eigenschappen der stammen van belang konden zijn bij de identificatie van *V. cholerae* en *V. El Tor*. Bovendien waren de onvolledige en tegenstrijdige gegevens in de literatuur aangaande de stofwisselingsproducten o.i. voldoende aanleiding om een onderzoek hierover ter hand te nemen.

Teneinde zoo groot mogelijke hoeveelheden der verschillende stofwisselingsproducten te verkrijgen moesten de omstandigheden in de cultuur-media zoo gunstig mogelijk zijn en in verband met het door *Nobecki* waargenomen feit, dat reeds na eenige dagen de vloeistof steriel zou zijn geworden, was het dus zaak om allereerst aan het p_H -verloop in de cultuurvloeistof aandacht te besteden. In reageerbuizen van 1,5 cm Ø en 15 cm hoogte werden in 10 cc van een medium van de volgende samenstelling:

glucose	5 gram,
Difco pepton	5 gram,
K ₂ HPO ₄	5 gram,
NaCl.	5 gram,
leidingwater	1000 gram.
p_H	7.4

een 18-tal vibrionenstammen geënt. De resultaten zijn weergegeven in de onderstaande tabel:

Tabel I

Verandering der p_H door *V. cholerae* en *V. El Tor*
in het glucose-peptonmedium. Aanvangs p_H 7.4.

V. CHOLERAЕ	1 d.	2 d.	3. d	4 d.
6/79	5.7	5.6	5.7	5.7
73/79	5.6	5.6	5.65	5.7
309/c	5.8	5.6	5.6	5.5
72854	6.3	5.6	5.65	5.7
218	5.85	5.7	5.7	5.75
250	5.9	5.7	5.7	5.8
301	5.9	5.7	5.7	5.8
305	5.8	5.7	5.75	5.7
311	5.9	5.75	5.75	5.75

V. EL TOR	1 d.	2 d.	3 d.	4 d.
D 12	6.20	5.90	5.70	5.85
D 31	5.60	5.70	5.60	—
D 62	5.65	5.60	5.60	5.70
D 72	5.80	5.70	5.80	5.80
D 82	5.60	5.60	5.70	5.70
D 30	5.95	5.85	5.85	5.85
D 31	5.70	5.60	5.60	—
D 67	5.80	5.80	5.90	5.90
D 70	5.60	5.70	5.80	5.80

Ook in vloeistoffen welke mannose of saccharose bevatten daalde de p_H van 8.0 in 24 uur tot 5.5—5.6. De afsterving der vibrionen in deze media was niet zoo sterk dat zij na 2—3 dagen steriel geworden waren, doch na een dag of 5 waren er toch reeds verschillende kolven, waaruit bij enting op endoplaten geen groei meer kon worden verkregen.

De hoeveelheid omgezette suiker, welke na 2 dagen $\pm$ 1 gram per L. en na 5 dagen hoogstens 2,5—3 gram bedroeg, was vergeleken bij andere bacterieele suiker vergistingen dan ook gering te noemen ¹⁾.

Er werd dan ook gezocht naar een middel om grootere suiker-omzettingen te verkrijgen. Gezien de zeer snelle daling van p_H 7—8 tot p_H 5.6 in één dag tijds, was niet veel heil te verwachten van sterker buffering van de vloeistof. Wel kon verwacht worden dat toevoeging van $CaCO_3$ in staat zou zijn, de door de ontstane zuren toenemende aciditeit geruimen tijd tegen te gaan. Het bleek dan ook dat de p_H , zoolang er overmaat $CaCO_3$ aanwezig was, op 6.4—6.5 gehandhaafd bleef. Hierdoor was het niet alleen mogelijk de culturen langeren tijd aan te houden (zelfs tot 4 weken), doch bovendien kon het aanvankelijke suikergehalte belangrijk verhoogd worden. Zodoende werd tenslotte een cultuurvloeistof gebruikt van de onderstaande samenstelling:

¹⁾ Zie hiervoor o.a.: A. Tasman en A. W. Pot: Ant. v. Leeuwenh. I, pg. 79, 179 (1934), waarin de stofwisselingsproeven met B. Parathyphus-B en B-paratyphus worden beschreven en M. A. Scheffer: Diss. Delft 1928, waarin o.a. hetzelfde wordt uitgevoerd voor B. typhosum, B. dysenteriae, B. coli en B. aerogenes.

glucose	20 gram,
Difco pepton	5 „
NaCl	5 „
CaCO ₃	15 „
ged. water	1000 „
P _H	7.2

Hoeveelheden van 1 L. worden gesteriliseerd in Erlenmeyer kolven van 1½ L. en daarna beënt met 10 cc van een dichte suspensie van de betreffende bacteriestam. De kolven blijven dan bij kamertemperatuur ($\pm 27.5^\circ$) staan en worden iederen dag omgeschud. Er ontwikkelen zich rijkelijk gasbellen, welke deels veroorzaakt worden door de inwerking der ontstane zuren met het krijt, deels direct ontstaan bij de suikerafbraak. Het bleek dat aan het eind der vergisting nog steeds krijt over was. De reinheid der culturen werd na afloop steeds gecontroleerd door uitstrijken op Endoplaten.

De wijze van analyseren der uitgegiste vloeistoffen is nu als volgt:

500 cc cultuurvloeistof wordt nauwkeurig geneutraliseerd t.o.v. lakmoes. Dan wordt ± 360 cc. afgedestilleerd, waarin eventueel aanwezige *alcoholen* overgaan. Blijkt het dat weinig alcohol aanwezig is, dan wordt deze nog eenige malen door overdestilleeren geconcentreerd, zoo niet dan wordt direct aangevuld tot een bepaald volume en met de methode van Northrop¹⁾ het alcoholgehalte bepaald. Hierbij worden de alcoholen met een bepaalde hoeveelheid 0.2 N. kaliumbichromaat in sterk zwavelzuurmilieu onder druk geoxydeerd tot de corresponderende zuren en het verbruikte chromaat titrimetrisch bepaald. Het bleek dat bij de toegepaste chroomzuuroxydatie slechts azijnzuur ontstond (hetgeen werd aangetoond door een gefractioneerde destillatie van 110 cc vlgs *Duclaux*). De mæthylalcohol werd bovendien nog bepaald langs pycnometrischen weg en waar beide uitkomsten overeenstemden mag worden aangenomen, dat alleen aethylalcohol aanwezig was. De jodoformreactie volgens Lieben was bovendien sterk positief.

De rest van de oorspronkelijke vloeistof wordt aangezuurd met zwavelzuur t.o.v. congorood en door middel van stoom worden de vetzuren in 1,5 L. vloeistof overgedestilleerd. Deze wordt met 0.1 N. baryt geneutraliseerd (t.o.v. phenolphthaleïne) en droogge-

¹⁾ J. H. Northrop: J. of Biol. Chem. 39, 1 (1919).

dampft op een waterbad. Uit het residu worden met zwavelzuur de vetzuren weer in vrijheid gesteld. Met Fincke's reagens geeft deze vloeistof een dik wit neerslag, terwijl met AgNO_3 zilverafscheiding optreedt (aanwezigheid van mierenzuur), terwijl ook de kakodyl-reactie positief is (azijnzuur). Het volume der nu verkregen vloeistof wordt tenslotte gebracht op 250 cc en wel zoodanig, dat per 110 cc een overmaat is van 10 cc 0.1 N H_2SO_4 aanwezig was. Men laat het BaSO_4 bezinken, zoodat de bovenstaande vloeistof slechts de vetzuren en een kleine hoeveelheid zwavelzuur bevat, waarna met $2 \times$ met 110 cc een destillatie volgens Duclaux¹⁾ 2) wordt uitgevoerd. Hierbij wordt van 110 cc vloeistof 10×10 cc afgedestilleerd en iedere fractie getitreerd. Ieder zuiver vetzuur geeft hierbij cijfers, die voor dat zuur karakteristiek zijn, terwijl bekende mengsels van verschillende zuren destillatiecijfers geven, welke te berekenen zijn uit de oorspronkelijke concentratie der zuren. Omgekeerd kan uit een bepaalde reeks cijfers aan de hand van de eerst gevonden ijkcijfers de samenstelling van een vetzuurmengsel worden uitgemaakt. Het bleek dat, zooals uit de oriëntatieproeven reeds te verwachten was, alleen mierenzuur en azijnzuur aanwezig waren. Ten einde uit de destillatiecijfers direct het gehalte van de beide componenten te kunnen afleiden, werden uit talloze bepalingen met zuiver mierenzuur, zuiver azijnzuur en mengsels van beide grafieken opgesteld, welke het vaststellen der verhoudingen zeer vergemakkelijken.

De rest van de stoomdestillatie wordt op een waterbad tot na-genoeg droog ingedampft, met watervrij natriumsulfaat gemengd en in een Soxhlet toestel aan een aetherextractie onderworpen. Uit dit extract ontstaat bij verdamping van de aether een gele stroop met vele kristallen. Na verdunning geeft de stroop met ferrichloride een kanariegele kleur (melkzuur), terwijl door KMnO_4 oxydatie in overeenstemming hiermede acetaldehyd gevormd wordt. De kristallen blijken na wasschen met alcohol en herhaaldelijk omsublimeeren een smeltpunt van 187°C . te bezitten en kunnen als barnsteen-zuur worden geïdentificeerd.

De totale hoeveelheid zuur wordt door titratie met 0.1 N. NaOH bepaald, waarbij eerst een overmaat loog wordt toegevoegd en de overmaat teruggetitreerd na verhitten gedurende 5 min. in een kokend

1) E. Duclaux: *Traité de Microbiologie*, Tome III, pg. 384 (1900).

2) Voor een uitvoerige beschrijving der methode zie o.a. J. B. van der Lek: *Diss.* Delft, 1930.

waterbad. Het melkzuur alléén wordt bepaald volgens Friedeman ¹⁾, door er met KMnO_4 in phosphorzuur-milieu acetaldehyde uit te vormen en dit in zuur natriumsulfiet op te vangen. Met jodium wordt de overmaat sulfiet weggenomen en het gevormde aldehyde bepaald door de aldehyde-sulfietverbinding te ontleden met verzadigde bicarbonaatoplossing, waarna het vrijgekomen sulfiet weer met jodium wordt getitreerd.

Het verschil wordt dan berekend als barnsteenzuur. Hoewel in de volgende mededeeling een kwantitatief overzicht zal worden gegeven der gevormde stofwisselingsproducten, mogen hier enkele cijfers volgen van een *V. cholerae*- en een *V. El Tor*-cultuur in het glucose-pepton-krijtmedium, teneinde een indruk te krijgen van de gevonden hoeveelheden, waarbij uitdrukkelijk vermeld zij, dat deze slechts betrekking hebben op enkele gevallen en allerminst een gemiddelde waarde van vele bepalingen bedoelen te zijn:

Tabel II.

Oriënteerende bepaling der hoeveelheden der stofwisselingsproducten door *V. cholerae* en *V. El Tor* in het glucose-krijtmedium.

	<i>V. cholerae</i> No. 2771	<i>V. El Tor</i> No. 82.
vergiste glucose	10.42 gr/L = 0,0579 gr.m.	12.40 gr/L = 0.0688 gr.m.
mierenzuur	0.0217 grmol/L	0.0273
azijnzuur	0.0144 „	0.0127
melkzuur	0.0501 „	0.0385
barnsteenzuur	0.0085 „	0.0018
aethylalcohol	0.0087 „	0.0013
a. m. carbinol	—	0.0001
koolzuur	positief	positief

Bij een hoeveelheid omgezette glucose van 10—15 gram/L zijn de hoeveelheden gevormde producten zeer goed te bepalen. Van de vetzuren wordt per 500 cc cultuurvloestof 150—200 cc 0.1 N zuur overgestoomd. Ook de Duclaux-bepalingen, welke het mogelijk maken om een mengsel van 10 cc 0.1 N mierenzuur en 10 cc 0.1 N azijnzuur kwantitatief te analyseren, geven met de hoeveelheden te onderzoeken zuur zeer goed reproduceerbare cijfers.

Van een apart portie van 200 cc wordt eerst 2×25 cc afge-

¹⁾ T. E. Friedeman en H. J. Kendall: Journ. of Biol. Chem. 82, 24 (1929).

destilleerd ter aantooning van eventueel aanwezig diacetyl. Daarna worden 20 vol. % ferrichloride toegevoegd en nogmaals eenige fracties van 25 cc overgedestilleerd ter bepaling van het acetylmethylcarbinol. Tenslotte wordt het residu met broom geoxydeerd en hiervan wederom een of meerdere keeren 25 cc afgedestilleerd ter bepaling van 2—3 butyleen-glycol. Voor de gedetailleerde uitvoering der bepalingen zij verwezen naar de publicatie van *Kniphorst* en *Kruisheer*¹⁾. De hoeveelheden van het gevonden acetylmethylcarbinol waren zoodanig, dat dit slechts als een nevenproduct in de geheele glucose dissimilatie beschouwd mag worden (40—60 mg Ni-neerslag per L., corresponderende met ong. 0.0001 grmol). Bij een enkele stam kon nog een spoor 2—3 butyleenglycol of een spoor diacetyl worden aangetoond.

Was voor de cultuur een vloeistof gebruikt, welke krijt bevatte, dan werd dit eerst met zwavelzuur omgezet in calcium-sulfaat.

De productie van koolzuur was, zooals reeds eerder werd uiteengezet, met het krijt-medium niet op eenvoudige wijze uit te voeren. Deze werd dan ook op andere wijze verricht en wel met het toestel van Eldredge, zooals dat beschreven is in de Amerikaansche „Standard-Methods”²⁾. In het eene been werd 30 cc difco-pepton-glucose medium (zie pg. 53) gebracht, terwijl in het andere been bij cholerastammen 10 cc en bij *El Tor* stammen 15 cc 0.1 N baryt werd gevuld. Reeds na één dag is de baryt met een wit laagje bariumcarbonaat bedekt, dat door schudden tot bezinken kan worden gebracht. Dit wordt herhaaldelijk gedaan en na 22 uren wordt het restant baryt bepaald.

In de eerste plaats bleek, dat alle 176 stammen, dus zoowel *V. cholerae* als *V. El Tor* uit glucose koolzuur produceerden. Voor *V. cholerae* stemt dit overeen met de gegevens welke *Linton*³⁾ publiceerde. Bij *V. El Tor* is echter geen overeenstemming, d.w.z. in de eerste mededeelingen van *Linton* c.s. (pg. 591) worden 9 *V. El Tor* stammen vermeld, behoorende in de 4e groep (volgens de chemische indeeling op grond van de bacterie proteïnen en koolhydraten), welke aeroob geen koolzuur produceeren. Op een andere

1) *L. C. E. Kniphorst* en *C. I. Kruisheer*: Z. f. Unters. v. Lebensm. 74, 477 (1937).

2) Leaflet VI: Further biochemical methods 7th. ed. (1937) van de uitgave van de Soc. Am. Bacteriologists Pure Culture Study of Bacteria.

3) *R. W. Linton, B. N. Mitra & D. N. Mullick*: Ind. J. Med. Res. 23 (1936) 589.

plaats¹⁾ worden een drietal El Tor-stammen beschreven, welke afkomstig waren van Doorenbos uit Alexandrië, nl. de nummers D 49, D 67 en D 20 en welke bleken te behooren tot de 5e groep en die wèl koolzuur produceerden. Van de door *Linton* vermelde 12 stammen gaven er dus 3 wèl en 9 geen koolzuur. Al onze 71 El Tor-stammen produceerden CO₂ en het is dus zeker niet juist om de CO₂-vorming uit glucose onder aerobe omstandigheden als verschil kenmerk voor *V. cholerae* en *V. El Tor* te beschouwen, een opvatting, welke we ook in het kort geleden verschenen proefschrift van *Gispen*²⁾ aantreffen.

In totaal werden 40 *V. cholerae* en 40 *V. El Tor*-stammen met de Eldredge toestelletjes onderzocht, waarbij de volgende resultaten werden verkregen.

38 <i>V. cholerae</i> stammen:	V. P. —,	CO ₂ : glucose = 0,52
2 <i>V. cholerae</i>	„ V. P. +,	CO ₂ : glucose = 0,66
32 <i>V. El Tor</i>	„ V. P. +,	CO ₂ : glucose = 0,88
8 <i>V. El Tor</i>	„ V. P. —,	CO ₂ : glucose = 0,55

We zien hieruit dat de verhouding van geproduceerde g mol CO₂ en omgezette g mol glucose bij de V. P. negatieve stammen (0,52 voor *V. cholerae* en 0,55 voor *V. El Tor*) steeds lager ligt dan die bij de V. P. positieve stammen (0,66 en 0,88).

Wij meenen hieruit te mogen concludeeren dat de productie van acetylmethylcarbinol steeds gepaard gaat met een (extra) koolzuur productie (een bewering, welke slechts geheel zou kunnen worden bewezen bij V.P. negatieve en positieve stammen van eenzelfde bacterie-soort, waarvan de V. P. negatieve in het geheel geen CO₂ zouden produceeren. Onderzoekingen in deze richting zijn dan ook ingezet).

Resumeerende konden dus de volgende stofwisselingsproducten worden aangetoond.

1) *R. W. Linton, D. L. Shrivastava & B. N. Mitra: Ind. J. Med. Res.* 22 (1936) No. 4.

2) Zie ook *R. Gispen: Proefschrift A'dam 1938.*

Tabel III.

Stofwisselingsproducten van *V. cholerae* en *V. El Tor*
bij aerobe-glucose dissimilatie 1).

	V. cholerae					V. El Tor					
	877/c	2771	72854	314/c1	91/29	D 30	D 68	D 82	D 88	D 7	D 45
Koolzuur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mierenzuur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aziijnzuur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melkzuur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Barnsteenzuur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aethylalcohol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2—3 butyleenglycol	—	—	—	—	—	—	—	—	sp	—	—
Ac. methylcarbinol	sp	—	—	sp	—	+	+	+	+	+	+
Diacetyl	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Er zij dus nog opgemerkt, dat de koolzuurbepaling geschiedde met een ander medium dan bij de vetzuur etc. bepaling werd gebruikt. In een volgende verhandeling hopen wij nader te berichten over kwantitatieve vergistingsbalansen, waarbij in één en dezelfde vloeistof alle producten werden bepaald, waarbij tevens zal worden nagegaan welk onderling verband of tusschen de geproduceerde hoeveelheden wellicht kan worden gezien met het oog op een nader biochemisch onderscheid tusschen *V. cholerae* en *V. El Tor*.

Samenvatting:

Daar over de stofwisselingsproducten van *V. cholerae* en *V. El Tor* in de literatuur zeer weinig exacte gegevens gevonden konden worden, werd hiernaar een onderzoek ingesteld.

1) Wellicht ten overvloede moge hier nog even de herkomst der verschillende stammen worden vermeld:

Stam 877/c werd Febr. 1938 uit Hanoi ontvangen.

Stam 2771 werd Nov. 1937 uit Hongkong ontvangen.

Stam 72854 werd Jan. 1938 uit Hongkong ontvangen.

Stam 314/c 1 werd Nov. 1937 uit Calcutta ontvangen.

Stam 91/79 werd Nov. 1937 uit Bangkok ontvangen.

De *El Tor*-stammen D 30, D 68, D 82, D 88, D 7 en D 45 werden alle van Dr. Doorenbos te Alexandrië ontvangen in den loop der jaren 1932—1938.

2) Voor afwijkingen zie: A. Mochtar en J. K. Baars: *Geneesk. Tijdschr. v. N. I.* 1938.

Het bleek dat in een glucose-pepton-krijt medium bij aerobe-cultuur door *V. cholerae* en *V. El Tor* de volgende stofwisselings-producten werden gevormd:

koolzuur, mierenzuur, azijnzuur, melkzuur, barnsteenzuur, aethylalcohol, terwijl *V. El Tor* bovendien bijna altijd acethyl-methylcarbinol produceerde en soms een spoor 2—3 butyleenglycol of diacetyl, zulks in tegenstelling met *V. cholerae*.

Bovendien bleek, dat de koolzuurproductie bij aerobe suiker-afbraak door de *V. P.* positieve *V. El Tor*-stammen per gmol. omge-zette glucose 0,88 gmol. CO_2 bedroeg, terwijl de verhouding bij de *V. P.* negatieve *V. cholerae*-stammen 0,52 bedroeg. Het onder-zoek wordt voortgezet.

Summary:

An investigation was set up after the aerobic metabolism of *V. cholerae* and *V. El Tor* in glucose broth, as there could not be found exact data about this in literature.

It turned out that the following dissimilation products are formed as well by *V. cholerae* as by *V. El Tor*.

Carbon dioxide, formic acid, acetic acid, lactic acid, succinic acid and aethyl alcohol. Besides this *V. El Tor* produces nearly al-ways acethylmethyl-carbinol with sometimes traces of 2—3 butylene glycol or diacetyl.

The ratio of produced carbon dioxide and fermented sugar was found with the Eldredge apparatus to be for the *V. P.* positive *V. El Tor* strains 0,88 and for the *V. P.* negative *V. cholerae* strains 0,52. The research is continued.

Salmonellose bij den mensch, veroorzaakt door *S. enteritidis* var. *essen*, na het eten van visch (snoek),

DOOR

Prof. G. KAPSENBERG ¹⁾.

Even ten Noorden van de gemeente Groningen ligt het plaatsje Noorderhoogebrug, aan het Boterdiep. Hier is, ten gevolge van de uitvoering van het Groningsche wegen- en kanalenplan, een bocht van het diep afgesneden. Deze is aan beide einden afgesloten, waardoor als het ware een langgestrekt meer ontstaan is, dat een lengte van ongeveer een halve K.M. heeft. Het water is vrij helder. Door een sloot staat het in verbinding met de omgeving.

Op 15 Juni 1937, in den morgen, bij koel weder, zwommen op eenmaal talrijke visschen aan het oppervlak. De bewoners van het plaatsje maakten hier gebruik van en vingen tal van visschen, met een schepnet. De visschen waren, zooals de bewoners het uitdrukken, „flauw”. Ze lieten zich betrekkelijk gemakkelijk vangen, doch hadden nog kracht genoeg om onder te duiken.

Een bewoner ving met zijn net een viertal matig groote snoeken. Deze werden kort na de vangst toeberaid. Van de nog levende visschen werd de kop afgesneden; daarna werden de ingewanden verwijderd. De visschen werden vervolgens in een pan met zout water gelegd, om den gronderigen smaak te doen verdwijnen, en in een koelen kelder bewaard. Den middag van denzelfden dag werden de schubben afgeschraapt, waarna de visch met regenwater afgewasschen en in versch zout water overgebracht werd. Ten slotte liet men de visch op een vergiet, gedurende den nacht, in den koelen kelder uitlekken. Den volgenden ochtend, 16 Juni, werd de visch in mooten gesneden, gezouten en gestoofd. Dit laatste hield in, dat de visch met een weinig water, citroensap

¹⁾ Voordracht gehouden 2 April 1938 te 's-Gravenhage voor de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie.

en boter even opgekookt en daarna ongeveer 1½ uur „tegen de kook aan”, achter op het fornuis, gaar gemaakt werd. Om half één werd de visch, vrijwel zóó van het fornuis, gegeten en wel door 7 personen, 14—55 jaar oud. Men at per persoon één tot twee mooten. De visch smaakte zeer goed.

Midden in den nacht, ongeveer 12 uur na het nuttigen, werden allen ziek. De verschijnselen waren: hevige diarrhoe, heftig braken, pijnlijke buikkrimp. De zieken gevoelden zich uitermate slap. Ze hadden vermoedelijk koorts (de temperatuur werd niet opgenomen). De ziekte-toestand duurde 4—5 dagen. Daarna bleef nog een tijdlang een gevoel van zwakte bestaan.

De overige dorpsbewoners, die geen snoek, maar andere visch hadden gevangen, en deze gebakken hadden gegeten, hebben niet den minsten last ondervonden.

Een oorzaak voor den plotseligen ziekelijken toestand van de vischbevolking kon niet worden aangegeven. Den 16den Juni was alles weer gewoon; nimmer is doode visch aan het oppervlak komen drijven. Wij hebben dus hier weer te doen met een van die raadselachtige, tijdelijke waterstoornissen, die voor visschen zoo noodlottig kunnen zijn.

Een dokter werd den 17den Juni te hulp geroepen. Door zijn bemiddeling werden aan het laboratorium toegezonden ontlasting en braaksel van een der patiënten, benevens een geëmailleerde pan met de resten van de visch (een paar middelmoeten en twee staartstukken).

Het bacteriologische onderzoek van het braaksel leverde niets op.

Uit de ontlasting werd zonder eenige moeite gekweekt een *Salmonella*, die tot de titergrens door een Gärtner-serum geagglutineerd werd, terwijl met een Paratyphus-B-serum slechts agglutinatie in de hoogste concentraties verkregen werd.

Zeer belangwekkend is het resultaat, dat het onderzoek van de visch opgeleverd heeft. De visch zag er zeer smakelijk uit; de geur was volkomen normaal. De bodem van de pan was bedekt met een laag gelei-achtige, vrijwel heldere saus, waarop gestolde boterdruppels dreven. Bij microscopisch onderzoek van deze saus werd geen enkel microörganisme gevonden. Het onderzoek werd daarom op het vischvleesch geconcentreerd. Twee mooten werden hiervoor uitgekozen. Van elke moot werden, na schroeien van het oppervlak, 5 vrij groote stukken in buizen met bouillon over-

gebracht. Tien buisjes bevatten aldus elk een boon- tot erwtgroot stuk spiervleesch. Na 24 uur waren 9 van de 10 buisjes troebel; één was evenwel helder en bleef steriel. In elk der negen buisjes waren kleine, levendig beweeglijke staafjes tot ontwikkeling gekomen. Afenting op agar leverde direct reine culturen. Van deze zijn 4 onderzocht, van elke moot 2 stammen. Alle vier hadden de cultureele kenmerken van een *Salmonella* en alle vier gedroegen zich in serologisch opzicht als de uit de ontlasting gekweekte stam.

Nadat de patiënten reeds lang genezen waren, werd bij 3 van hen bloed afgetapt. Bij alle 3 agglutineerde het serum zwak, doch duidelijk, den ontlastingstam, den snoekstam en den laboratoriumstam, terwijl de agglutinatie met *S. paratyphi B* volkomen negatief was.

Zooals bekend is, vertoont de agglutinatie-titer van sera van patiënten, die geleden hebben aan vleeschvergiftiging door een *Salmonella*, in den regel slechts een geringe hoogte. De reactie van Widal kan zelfs geheel negatief uitvallen. (E l k e l e s e n S t a n d f u s z (1) K a u f f m a n n (2)). Dit is waarschijnlijk het gevolg van de omstandigheid, dat het contact tusschen organisme en smetstof van korten duur en weinig intens is. De bacteriën verlaten het lichaam snel en gaan slechts in gering getal in de bloedbaan over.

Dank zij het werk van Duitsche (met name Kielsche) en Engelsche onderzoekers is het mogelijk geworden om nader uit te maken, tot welke soort een *Salmonella* behoort. Om deze determinering, aan de hand van het schema van Kauffmann—White, en op grond van cultureel-biochemische eigenschappen, uit te voeren moet men de beschikking over speciale sera en voedingsbodems hebben en bovendien over voldoende geoefendheid beschikken.

Dr. J a c. J a n s e n, werkzaam op het Instituut voor parasitaire en infectieziekten te Utrecht, was dadelijk bereid om de door mij gekweekte stammen nader te onderzoeken. Zoowel de snoekstam als de ontlastingstam bleken te behooren tot *S. enteritidis* var. *essen*, dus tot de soort, die door J a n s e n (3) en door H o h n e n H e r r m a n n (4) in 1935, onafhankelijk van elkander, als een *Salmonella* met bepaalde eigenschappen onderkend is en die herhaaldelijk in besmette eendeneieren gevonden wordt. Nadere bijzonderheden worden door Dr. J a n s e n in het artikel, dat bij het mijne aansluit, beschreven.

De in zijn soort wel zeldzame vorm van voedselvergiftiging, die

ik waarnam, geeft uiteraard aanleiding tot enkele beschouwingen en bespiegelingen.

1. Voedselvergiftiging door visch komt betrekkelijk weinig voor, en zulk een, waarvan een *Salmonella* de oorzaak is, behoort tot de zeldzaamheden. Voor mij persoonlijk is de beschreven waarneming het eerste geval met betrekking tot het ontstaan van een salmonellose door het eten van visch.

In de meeste gevallen van voedselvergiftiging door visch is vermoedelijk de „enterotoxische stof” van *Jordan* (5) het oorzakelijke agens, welke stof door allerlei bacteriën, onder bepaalde omstandigheden, in voedsel gevormd kan worden, met name door *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Proteus* en *Salmonella*. Verder moet nog herinnerd worden aan het ontstaan van botulisme (*ichthyismus*) na het eten van geconserveerde visch.

Toch zijn er wel enkele gevallen in de literatuur te vinden, waarbij door het nuttigen van visch een salmonellose ontstond. Zoo beschrijft *Eckersdorff* (6) hoe ongeveer 30 personen kort na het eten van vischmayonnaise, gemaakt van een grooten „Seehecht”, d.i. een soort schelvisch, ziek werden onder het beeld van voedselvergiftiging. Uit de resten van de vischschotel werden „paratyphusbacillen” gekweekt. Het onderzoek van later ingestuurde ontlasting leverde geen resultaat op. Bij eenige patiënten werd het serum onderzocht. Het bleek paratyphusbacillen te agglutineeren.

Snijders (7) deelt een geval van voedselvergiftiging na het nuttigen van gekookte zeevisch mede. Zekerheid, dat de oorzaak van de Gärtner-infectie inderdaad het gevolg van het eten van deze visch was, bestaat evenwel niet, daar de visch niet onderzocht kon worden. De waarschijnlijkheid is echter groot.

In 1920 publiceerde *Bitter* (8) de uitkomsten van zijn onderzoek betreffende een massa-vergiftiging, met 3 sterfgevallen, gevolg van het eten van gerookte makreel. Hier was een paratyphusbacil van het Breslau-type (dus *S. typhi murium*) de verwekker. De makreelen waren volgens *Bitter* vermoedelijk na den dood, vóór het rooken, door ijs, ontleend aan bevroren oppervlaktewater, besmet. De paratyphusbacillen werden uit een der makreelen (de rest was geheel verkocht en verbruikt) gekweekt.

Een waarneming, volkomen overeenkomende met de door mij gedane, heb ik in de literatuur niet kunnen vinden. Zij staat wellicht op zichzelf. Hier heeft men als het ware te doen met een voedselvergiftiging, veroorzaakt door vleesch, afkomstig van „in nood

geslachte visschen'', dus met een analogon van de voedselvergiftiging door vleesch, afkomstig van een in nood geslachte koe of ander slachtdier.

Een waarneming, die veel overeenkomst met de mijne vertoont, is beschreven door Reiner Müller (9) in 1914. De schuldigen waren hier op normale wijze gevangen, in helder water levend gehouden palingen. Deze werden nog levend in bereiding genomen en gebraden gegeten. 6 personen werden ziek. De verschijnselen waren van gastro-enteritischen aard, gepaard met koorts. Uit de palingmooten en uit de ontlasting van 3 der patiënten werd *S. typhi murium* gekweekt.

2. Op welke wijze de snoeken geïnfecteerd geraakt zijn, kan ik niet met zekerheid uitmaken. Als het meest waarschijnlijk komt het mij voor, dat zij in vivo besmet zijn.

Dat in oppervlaktewater *S. enteritidis* var. *essen* voor kan komen, is zeer goed mogelijk ¹⁾. Een bekende bron voor besmetting is de door *S. enteritidis* var. *essen* aangetaste eend. Zulk een dier kan de kiemen met se- en excreta verspreiden ²⁾. Af en toe zwommen eenden in het water, waaruit de snoeken gevangen werden.

Het is vastgesteld, dat visschen gemakkelijk bacteriën in het spiervleesch, d.w.z. in de lympe- en bloedvaten daarvan, opnemen. Vischvleesch, onmiddellijk na het dooden van een visch ontnomen, bevat steeds, en dikwijls zelfs een groote hoeveelheid, bacteriën. Gegevens hieromtrent zijn te vinden in een rapport van Van Driest (10). Deze vermeldt, dat Ewart (11) reeds in 1887 vaststelde, dat het spiervleesch van gezonde visschen, onmiddellijk na den dood onderzocht, niet steriel was. Van Driest zelf deed voornamelijk onderzoekingen met schelvischen (*Gadus aeglefinus*), die levend in het laboratorium aankwamen. De visch werd gedood; direct daarna werd van een gram spiervleesch (steriel ontnomen) een suspensie gemaakt, waarna hiermede in verschillende verdunningen gelatineplaten gegoten werden. Steeds werden bacteriën gevonden. De getallen (berekend op 1 gram vleesch) liepen uiteen van maximaal 3200 tot beneden de 100. Bij een kleine kabeljauw, op precies dezelfde wijze onderzocht, bleken 6600 bac-

¹⁾ Water van het afgedamde gedeelte heb ik niet onderzocht.

²⁾ Of gezonde eenden door besmet water geïnfecteerd kunnen worden, is, voor zoover mij bekend, nog niet uitgemaakt. Dit is echter wel waarschijnlijk te achten, daar besmetting per os, althans bij eendekuikens, gemakkelijk aanslaat.

teriën aanwezig te zijn. Gevonden werden vooral staphylococcen. Geheel in overeenstemming hiermede is, dat hij volkomen verse, doch doode visch steeds bacteriën in het spiervleesch aangetroffen worden: immers deze dringen niet naar binnen, doch ze zijn er reeds. Zoo werden bij verse zeetong (*Solea vulgaris*) waarden tot 4200 bacteriën gevonden. Hetzelfde geldt ook voor zoetwatervisschen. Ulrich (12) vond in het vleesch van verse, gedeeltelijk zelfs nog levende zoetwatervisschen, gevangen in het Züricher meer, aanzienlijk veel bacteriën.

Uit deze onderzoekingen blijkt wel duidelijk, dat er bij de visschen niet zulk een stevige slagboom tegen het indringen van bacteriën als bij de zoogdieren bestaat. Voor dit merkwaardige verschijnsel is wellicht een verklaring te vinden in den histologische bouw van de visschen. De desbetreffende gegevens en literatuur dank ik aan de tegemoetkomendheid van Prof. dr. E. H. Hazelhoff (13).

Bacteriën kunnen de vischspieren principieel langs drie wegen binnendringen: langs het maagdarmkanaal, de huid en de kieuwen.

De bouw van het slijmvlies van het maagdarmkanaal der visschen komt in groote trekken overeen met dien der zoogdieren. Bij de beenvisschen bezit het maagsap een zeer sterke verterende werking. Dit werd reeds door Spallanzani vastgesteld, o.a. bij een snoek. Het maagsap bevat een peptisch ferment, dat, in overeenstemming met den aard van een visch, ook bij lagere temperaturen krachtig werkt. Merkwaardig is het, dat volgens Van Herwerden (14), de reactie van de spijsbrei meest neutraal of alkalisch, een enkele maal zwak zuur is.

In het algemeen wordt aan de zure reactie van het maagsap bij de zoogdieren een kiemdoodende werking toegeschreven. Het werkzame agens is waarschijnlijk het pepsine (onderzoekingen, die dit bewijzen, zijn bij mijn weten echter niet verricht). Ook van het, bij zwakzure tot alkalische reactie krachtig werkzame vischen-pepsine moet wel een bactericide werking uitgaan. Trouwens de maaginhoud van visschen ziet er (afgescheiden van de verandering door de proteolyse) „normaal” uit.

Daar een visch, bij de voedselopneming, niet meer water naar binnen krijgt, dan in het voedsel aanwezig is, is de kans op besmetting door water, langs het maagdarmkanaal, vermoedelijk niet veel grooter dan bij landdieren.

Alles bijeen lijkt het niet waarschijnlijk, dat de in vischvleesch

aanwezige bacteriën langs het maagdarmkanaal naar binnen gedrongen zijn.

De huid van de visschen kan echter zeer goed als ingangspoort voor de bacteriën dienst doen. De epidermis bestaat wel uit meer lagen epitheel, maar hierdoorheen loopen fijne lymphevaten, die bijna tot aan het oppervlak, vlak onder de schubben reiken.

De kieuwen vormen wellicht de beste toegangspoort. De kieuwbogen met de talrijke kieuwplaatjes, waarop, om het al reeds zeer groote oppervlak nog te vergrooten, zeer veel plooien voorkomen, bieden den bacteriën een zeer groot aanrakingsvlak aan. De epitheliale bedekking bestaat verder slechts uit één laag plaat-epitheel. Onmiddellijk hier tegen ligt het rijke net van arterieele en veneuze capillairen.

Het verband tusschen spiervleesch en kieuwen komt zeer duidelijk naar voren in een publicatie van Schuster—Woldan (15). Als men levende visschen (als proefdieren dienden 5 soorten zoetwatervisschen, waaronder forel en paling) in water brengt, waarin neutraalrood is opgelost, dan is binnen korten tijd al het spiervleesch rood gekleurd. Kieuwen en huid zijn eveneens sterk gekleurd. De onderzoeker stelt door proeven vast, dat het huid noch darmkanaal zijn, die de kleurstof doorlaten, maar de kieuwen. Bij doode visschen kleuren zich, onder overigens gelijke omstandigheden, de huid en de kieuwen nauwelijks en neemt het spiervleesch heelemaal geen kleurstof op. Hoewel deze proef geschiedde met een opgeloste stof, wijst zij toch zeer nadrukkelijk op de mogelijkheid, dat langs de kieuwen bacteriën in het spiervleesch kunnen geraken. Een geringe laesie van het epitheel maakt den toegang tot de bloedbaan voor de bacteriën vrij.

Op welke wijze het voorkomen van bacteriën in normaal vischvleesch verklaard moet worden, is per slot van rekening een kwestie van experimenteren; vast staat, dat ze er onder normale omstandigheden in komen. En het is daarom zeer aannemelijk dat, als in de omgeving *Salmonella's*, met name in het water, voorkomen, deze ook opgenomen worden. Dit zal waarschijnlijk nog des te gemakkelijker gaan, naarmate de conditie, waarin de visschen verkeerden, slechter is, evenals bij verzwakt slachtvee gemakkelijk *Salmonella's* uit het darmkanaal naar binnen dringen (secundaire *Salmonellosen* van Standfusz (15)).

Op de voorbereiding van de snoeken, die in mijn waarneming de groote rol spelen, kan vóór noch tijdens het stoven ook maar een

enkele aanmerking gemaakt worden. Een postmortale infectie is daarom wel buiten te sluiten. Een eenigszins aanzienlijke vermeerdering van bacteriën, speciaal van *Salmonella*'s, in den koelen kelder, kan eveneens buiten beschouwing blijven. Vischvleesch is overigens voor deze bacteriën een goede voedingsbodem (Ulrich (12).

Ten slotte moet er nog op gewezen worden, dat postmortale infectie van het vleesch onzer slachtdieren, volgens de opvattingen uit den laatsten tijd, veel minder plaats vindt, dan intravitale: ten minste 90% van de vleeschinfecties geschiedt intravitaal (Standsz (16).

Op grond van al deze overwegingen acht ik het in hooge mate waarschijnlijk, dat de snoeken in vivo met *Salmonella*'s besmet werden.

Dat de *Salmonella*'s in het vischvleesch tijdens het stoven niet, althans niet allemaal, gedood zijn, wekt eenige bevreemding, maar is op zichzelf een omstandigheid, die zich aansluit bij de ervaring, opgedaan bij de gewone vleeschvergiftiging. *Salmonellosen* zijn herhaaldelijk door gekookt of gebraden vleesch verwekt. Worsten, vervaardigd van een paratyphusbacillen bevattende vleeschbrei, waren ondanks koken gedurende 2 uur nog infectieus (1).

Ten aanzien van visch is Eckersdorff (6) van oordeel, dat bij de in de keuken gebruikelijke wijze van voorbereiding paratyphusbacillen niet gedood worden, omdat de daarvoor noodige hitte in het binnenste der stukken niet bereikt wordt. Hij nam een moot van een „Seehecht”, lang 15 cm., breed en hoog 10 cm., infecteerde deze met paratyphusbacillen en kookte deze moot gedurende een half uur in een gewone kookpan. Het oppervlak kreeg een temperatuur van 100°, het binnenste van slechts 42°. Toch had ook het binnenste onbegrijpelijkwijze het uiterlijk van gekookte visch. Hoe de temperatuurmeting geschiedde deelt Eckersdorff niet mede. Hij spreekt van „annäherenden Temperaturen”. Uit het midden en uit het binnenste van de moot kon hij paratyphusbacillen kweken.

Dat in het door mij onderzochte snoekvleesch *Salmonella*'s gevonden werden, behoeft niet te verwonderen. De mooten zijn even opgekookt en daarna achter op het fornuis gaar gestoofd. In het vischvleesch kunnen nog best gedeelten overgebleven zijn, waarbinnen de temperatuur niet hoog genoeg was, om doodelijk te wer-

ken. Zeer veel bacteriën waren er waarschijnlijk in het onderzochte materiaal niet. Immers ik onderzocht groote stukken en één daarvan bleek volkomen steriel te zijn. Deze opvatting wordt gesteund door het tijdstip, waarop de ziekteverschijnselen optraden. De visch was niet direct toxisch, zij werd dit eerst ongeveer 12 uur na den maaltijd, toen diarrhoe en braken acuut. inzetten. Elkeles (17) verklaart dit op deze wijze, dat de *Salmonella's* zich in het maag-darmkanaal, in de spijsbrei, vermeerderen en dat vervolgens een groot aantal bacteriën (onder invloed van de darmfermenten?) te gronde gaan, waarbij giftige endotoxinen vrij komen.

L I T E R A T U U R.

1. G. Elkeles en R. Standfusz. Handb. der path. Mikroorg. 3. 1747. (1931).
2. F. Kauffmann. Ergebnisse der Hyg. 15. 267. (1934).
3. Jac. Jansen. Z. f. Bakt. I.O. 135. 414. (1935).
4. J. Hohn en W. Herrmann. Z.f. Bakt. I.O. 134. 277. (1935).
5. E. O. Jordan. Foodpoisoning and food-borne infection. (1930).
Report of Proc. Sec. Int. Congress f. Microbiology. London. p. 155. (1936).
6. Eckersdorff. Arb. Inst. f. exp. Ther. Frankfurt a. Main. H. 4. (1908).
7. E. P. Snijders. Gen. T. v. Ned. Indië 57. 1. (1917).
8. L. Bitter. Z.f. Hyg. und Inf. Krankh. 90. 387. (1920).
9. Reiner Müller. Münch. med. Wochenschr. 471. (1914).
10. P. A. van Driest. Onderzoekingen omtrent kunstmatige afkoeling van Visch, verricht in het Lab. v. Verg. Path. der R.U. te Leiden (Dir. Prof. Dr. D. A. de Jong), (1915).
11. J. C. Ewart. The preservation of fish. Londen. (1887), geciteerd uit 10.
12. S. Ulrich. Z.f. Hyg. und Inf. Krankh. 53. 176. (1906).
13. De gegevens zijn ontleend aan:
 - a. W. Biedermann in Erg. der Biol. 1. (1926).
 - b. W. Wunder. Phys. der Süßwasserfische Mitteleuropas. (1936).
 - c. H. Winterstein in Wintersteins Handb. d. Vergl. Physiologie 1. 131. (1921).
 - d. W. Biedermann in Wintersteins Handb. d. Vergl. Physiologie. 2. (1911).
14. M. van Herwerden. Z.f. phys. Chemie. 56. 453. (1908), geciteerd uit 13d.
15. E. Schuster—Woldan. Arb. a. d. Reichsges. amte. 70. 463. (1937).
Arch. f. Hydrobiol. 30. 352. (1936).
16. R. Standfusz. Erg. der Hyg. 15. 659. (1934).
Bakt. Fleischbeschau. (1936).
17. G. Elkeles. Erg. der Hyg. 11. 117. (1930).

Eenige opmerkingen betreffende *S. enteritidis* var. *essen*. (Naar aanleiding van „essen” infectie bij den mensch na het eten van snoek)

DOOR

Dr. JAC. JANSEN ¹⁾

In het hieraan voorafgaande artikel werd een geval van voedselvergiftiging bij den mensch beschreven, waarbij de diagnose *Salmonellose* werd gesteld: „Uit de ontlasting werd zonder eenige moeite gekweekt een *Salmonella*, die tot de titergrens met een Gärtner-serum geagglutineerd werd”. Volgens een door mij verrichte nadere determinatie bleek deze *Salmonella* te zijn: *S. enteritidis* var. *essen*. Hetzelfde microorganisme werd aangetoond in het door de patiënten genuttigde gerecht nl. in gekookte snoek. Naar ik meen is dit in Nederland het eerste geval van „essen” infectie bij den mensch. In het dierenrijk nl. vooral *bij de eend* is deze infectie, ook in Nederland, reeds eenige jaren bekend. In 1935 heb ik er evenwel reeds op kunnen wijzen dat behalve bij den mensch en de eend deze infectie ook bij andere dieren mogelijk is, bij kippen-kuikens werd nl. hetzelfde microorganisme door mij aangetoond.

Eén der kenmerkende eigenschappen van *S. enteritidis* var. *essen* is het vertraagd of niet omzetten der dulcitol. Zeer waarschijnlijk hebben Müller en Rodenkirchen in 1933 uit eendeneieren deze *Salmonella* gekweekt, want zij vermelden het traag omzetten der dulcitol; zij spreken evenwel van Jenastammen wat niet juist kan zijn daar de echte Jena: *S. enteritidis*, juist zeer snel vergist. Dergelijke dulcitol trage stammen werden ook door Honn en Herrmann in Duitschland gekweekt uit den mensch en in

¹⁾ Voordracht gehouden 2 April 1938 te 's Gravenhage voor de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie.

Nederland door mij uit eenden sinds 1933. In 1935 bleek zoowel aan H o h n en H e r r m a n n als aan mij, dat het hier een apart type van *Salmonella* moest betreffen.

De antigeenstructuur beschreef ik uitvoerig in het Zentralblatt für Bakteriologie. (I Orig. **135**, 414. (1935) en in dit tijdschrift (Antonie van Leeuwenhoek **3**, 241, (1936)).

Vastgesteld werden de antigeenfactoren: IX, g.o.m. waar later nog aan toegevoegd kon worden de bij vele *Salmonella*'s voorkomende factor XII (ook wel genoemd XIII) terwijl de nadruk gelegd werd op het dulcitol trage karakter. H o h n en H e r r m a n n hebben vooral een cultureel-biochemisch onderzoek verricht, niet alleen van deze *Salmonella* doch van het geheele genus *Salmonella*; zij hebben hierop een nieuwe indeeling gebouwd. Volgens de indeeling naar de antigeenstructuur hoort deze, door H o h n en H e r r m a n n *S. enteritidis* var. *essen* genoemde *Salmonella* thuis in de D rubriek van het K a u f f m a n n - W h i t e schema, nl. op grond van het lichaams- (O-) antigeen IX. Daar het geesel- (H-) antigeen g.o.m. is, hoort de „essen” in de z.g.n. „*enteritidis*” groep. Toen het internationale *Salmonella*-comité in 1934 dit K a u f f m a n n - W h i t e schema vaststelde, kende men in de enteritidis groep de volgende *Salmonella*'s:

<i>S. enteritidis</i>	IX, g.o.m.
<i>S. enteritidis</i> var. <i>danysz</i>	IX, g.o.m.
<i>S. enteritidis</i> var. <i>dublin</i>	IX, g.p.
<i>S. enteritidis</i> var. <i>rostock</i>	IX, g.p.u.
<i>S. enteritidis</i> var. <i>moscow</i>	IX, g.o.q.
Deze groep is thans:	
<i>S. enteritidis</i>	IX, XII, g.o.m. $z^1 z^2$
<i>S. enteritidis</i> var. <i>danysz</i>	IX, XII, g.o.m.
<i>S. enteritidis</i> var. <i>essen</i>	IX, XII, g.o.m.
<i>S. enteritidis</i> var. <i>chaco</i>	IX, XII, g.o.m.
<i>S. enteritidis</i> var. <i>dublin</i>	IX, XII, g.p.
<i>S. enteritidis</i> var. <i>rostock</i>	IX, XII, g.p.u.
<i>S. enteritidis</i> var. <i>moscow</i>	IX, XII, g.o.q. z^3
<i>S. enteritidis</i> var. <i>blegdam</i>	IX, XII, g.o.m.q.z. ¹

H o h n en H e r r m a n n die wel degelijk aan het K a u f f m a n n - W h i t e schema zeer groote waarde toekennen staan op het standpunt dat de cultureel-biochemische eigenschappen minstens van even groote waarde zijn. Zij stellen dan ook naast elkaar het

z.g.n. „Serotyp” en het „Kulturtyp”. Dit laatste wordt volgens een door hen ontworpen systeem bepaald. Zij onderzoeken *Salmonella* zoowel in een N rijk als in een N arm milieu. Het rijke milieu is de Hottingerbouillon bereid van stierentestikels. Het voordeel van deze voedingsbodem is 1e. het vrij zijn van koolhydraten en 2e. de rijkdom aan eiwitten en aminozuren. Het arme milieu is het „Simmons-substraat” waar de eenigste N bron is het $\text{Na}(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$.

De volgende reeks voedingsbodems wordt nu geënt: dextrose, arabinose, rhamnose, dulcitol en Na citraat in Simmonssubstraat en dextrose, arabinose, rhamnose en dulcitol in Hottingerbouillon. De omzetting der koolhydraten is op de Simmonsbodem, die vast is, te zien aan de kleuromslag en in de Hottingerbouillon aan de kleuromslag eventueel gevolgd door gasvorming. Onderzoekt men nu de enteritidis groep volgens dit systeem dan krijgt men:

	Simmons-substraat					Hottingerbouillon			
	d.	a.	r.	d.	n.	d.	a.	r.	d.
<i>S. enteritidis</i>	+	+	+	+	+	++	++	++	++
„ „ var. <i>danyasz.</i> ..	+	+	z	+	+	++	++	++	++
„ „ „ <i>essen</i> ..	+	—	+	—	+	++	++	++	— ¹⁾
„ „ „ <i>chaco</i> ..	+	+	+	z	+	++	++	++	—
„ „ „ <i>dublin.</i> ..	z	—	—	—	z	++	—	++	++
„ „ „ <i>rostock.</i> ..	z	z	—	z	z	++	++	—	++
„ „ „ <i>moscow.</i> ..	+	+	+	z	+	++	++	++	—
„ „ „ <i>blegdam.</i> ..	+	+	+	z	+	++	++	++	—

z = zwakke omzetting.

¹ = eerst —, daarna omzetting.

Uit het bovenstaande blijkt dat het *essentype* gekenmerkt is door het arabinose negatief zijn en het dulcitol negatief zijn op de Simmonsbodem en het dulcitol traag zijn in de Hottingerbouillon. Een groot aantal eendenstammen werd reeds onderzocht en steeds werd dit cultuurtype gevonden. De uit de snoek en uit de patient gekweekte stammen werden allereerst onderzocht volgens de definitie betreffende het genus *Salmonella*, opgesteld door het internationale comité van 1934. De stammen bleken hier geheel aan te voldoen. Uit een agglutinatorisch onderzoek (o.a. het apart aantoonen van de IX en de m factor) bleek dat deze *Salmonella* tot de *enteritidis*-groep moest behooren. Een onderzoek op de Simmons-Hottinger rij toonde aan, dat de stammen het „essen” cultuurtype

hadden, zoodat de diagnose *S. enteritidis* var. *essen* gesteld werd.

Behalve bij de eend en bij den mensch (welke wellicht in de meeste gevallen door de eend geïnfecteerd geweest zal zijn) is de *S. enteritidis* var. *essen* ook nog bekend bij kippenkuikens. Tot nu toe heb ik dit slechts in twee gevallen kunnen vaststellen. In geen van beide gevallen was de eend als infectiebron uit te sluiten, n.l. de eerste maal betrof het kippenkuikens van een bedrijf waar eenden besmet met *S. enteritidis* var. *essen* aanwezig waren, de tweede maal kuikens, afkomstig van een broederij die ook eenden-eieren uitgebroed had. Experimenteele infectie per os gelukt bij kippen-kuikentjes gemakkelijk. Bedenkt men hierbij tevens nog dat na intramusculaire infectie van een kip, de „essen” bij sectie uit het ovarium geïsoleerd werd, dan is het spontaan voorkomen van *S. enteritidis* var. *essen* in kippeneieren mogelijk te achten. Bij voedselvergiftiging door *S. enteritidis* var. *essen* bij den mensch denke men dus niet uitsluitend aan de eend, doch o.a. ook aan de kip en eventueel andere dieren.

Bij levende snoek is de „essen”-infectie nog nimmer aange-toond; de vraag of in dit geval van „essen”-infectie bij den mensch na het eten van bereide snoek, de snoek tijdens zijn leven reeds geïnfecteerd was is niet met volledige zekerheid te beantwoorden.

Het feit echter dat het hier visch, dus een dier uit het water betreft, en de eend tevens een waterdier is, geeft eenige neiging tot het zoeken van verband tusschen de eenden„essen”-infectie en het aantoonen van de „essen” in de gekookte snoek; dit vermoeden wordt eenigermate versterkt door het feit dat meerdere gevallen van voedselvergiftiging, veroorzaakt door een *Salmonella*, bij den mensch na het eten van visch bekend zijn.

(Welke *Salmonella*'s dit in die gevallen geweest zijn is, daar de classificatie nog niet zoo ver gevorderd was als thans, niet bekend.)

Het is dus noodzakelijk om bij het vinden van „essen”-infectie bij den mensch ook aan de mogelijkheid te denken dat visch de oorzaak zou kunnen zijn.

L I T E R A T U U R.

Voor literatuur moge ik verwijzen naar mijne publicaties en de daarbij behorende literatuurlijsten:

1. Eendensalmonellose en hare beteekenis voor den mensch. *Antonie van Leeuwenhoek*, **3**, 184 (1936).
2. Ueber die Klassifikation der Typhus-Paratyphus-Gruppe. *Zeitschrift f. Inf. Krankh.*, **52**, 11 (1937).

ANTONIE VAN LEEUWENHOEK

NEDERLANDSCH TIJDSCHRIFT VOOR HYGIËNE, MICROBIOLOGIE EN SEROLOGIE

Orgaan van de Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie



Onder redactie van Prof. Dr. W. C. DE GRAAFF, Hoogleraar a. d. Rijksuniversiteit
te Utrecht en Dr. W. Aeg. TIMMERMAN, Directeur van het
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht.

Vaste medewerkers: Prof. Dr. L. DE BLIECK (Utrecht), Prof. Ir. B. VAN DER BURG
(Wageningen), J. P. BIJL (Utrecht), Dr. W. DOORENBOS (Alexandrië), Prof. Dr.
P. C. FLU (Leiden), Dr. T. FOLPMERS (Rotterdam), Dr. J. A. VAN HASSELT (Amsterdam),
Dr. J. VAN DER HOEDEN (Utrecht), Prof. G. KAPSENBERG (Groningen), Prof. A. KLEIN
(Den Haag), Prof. Dr. A. KLUYVER (Delft), Prof. Dr. J. J. VAN LOOHEM (Amsterdam),
Dr. P. A. MEERBURG (Bussum), Dr. S. L. SCHOUTEN (Utrecht),
Prof. Dr. W. A. P. SCHÜFFNER (Amsterdam), Prof. Dr. J. SMIT (Wageningen),
A. J. VITRINGA (Amsterdam), Prof. Dr. JOHA WESTERDIJK (Baarn).

N.V. SWETS EN ZEITLINGER
BOEKHANDEL EN UITGEVERSMATSCAPPIJ, AMSTERDAM



INHOUD.

	blz.
Verslag van de Vergadering der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie	67
Prof. Dr. P. C. FLU, Het kation Mg^{++} en de lysis van <i>Bacterium Megatherium</i> door den <i>Bacteriophag antimegatherium</i>	74
F. WESTENDORP BOERMA, Over de verdeeling van de agglutinenen over de serumeiwitten	86
B. WALCH-SORGDRAGER en H. BOHLANDER, Over de verdeeling der leptospirastammen in groepen door middel van de agglutinatie-lysis reactie	100
H. A. DIDDENS, Saltaties bij Schimmels	112
Jonkvr. M. VAN RIEMSDIJK, Een eenvoudige methode tot het zuurstof-vrij maken van het plaatoppervlak voor het kweeken van Anaerobionten	135

Verslag van de Vergadering der Nederlandsche Vereeniging voor Microbiologie

op Zaterdag 12 November 1938 in het Hygiënisch Laboratorium der Universiteit te Utrecht.

Ingekomen stukken.

1°. Brief van prof. Rivers, waarin verzocht wordt aan den-gene, die het 3e Internationale Congres voor Microbiologie te New-York, 2—9 Sept. 1939, wenscht te bezoeken en daar een voordracht wil houden, thans onmiddellijk aan hem op te geven in welke sectie hij wenscht te spreken met vermelding van onderwerp en voor 1 Maart 1939 een extract van niet meer dan 200 woorden aan den General Secretary in te zenden.

2°. Brief van den secretaris-generaal van het Ministerie van Onderwijs met programma van het 4e internationale congres voor vergelijkende pathologie van 15—20 Mei 1939 te Rome.

3°. Eenige overdrukken van het Pathologisch Laboratorium Medan (Sumatra) uit het geneeskundig tijdschrift voor Nederlandsch Indië, behandelende „Dysenterie Sonne” en „Mycetoma pedis (Maduravoet.)”

4°. Brief van de firma Swets & Zeitlinger van 10 Juni 1938, waarin vermeld wordt, dat, ongeacht de beneden vermelde, toekomstige, tegemoetkomingen in de onkosten, een nieuwe kostenberekening van het tijdschrift neerkomt op een bijdrage van f 10 per lid der vereeniging.

Daarna heeft de verkiezing van een voorzitter plaats voor prof. dr. P. C. Flu, die in 1939 volgens rooster moet aftreden. Gekozen wordt prof. dr. J. Smit te Wageningen; hij maakt het bezwaar, dat thans in het Bestuur de medici onvoldoende vertegenwoordigd zijn. Verschillende medici ter vergadering aanwezig blijken dit bezwaar niet te deelen, waarop de heer Smit zijn benoeming aanvaardt. Als plaats der voorjaarsvergadering wordt op verzoek van den, pas gekozen, voorzitter gaarne Wageningen aanvaard, terwijl als datum vastgesteld wordt Zaterdag 13 Mei.

Tijdschrift.

Vervolgens komt de bespreking over het tijdschrift aan de orde. De secretaris deelt de resultaten van zijn bezoek, met den heer van Nederveen, mee aan den uitgever van het tijdschrift op Zaterdag 9 April 1938. Daarbij werden de volgende vereenvoudigingsvoorstellen gedaan, in te gaan volgend jaar, nadat de firma uit de boeken had aangetoond, inderdaad met de toelage van f 7.50 per lid niet toe te kunnen.

1°. Elke inzender neemt met 12 afdrucken genoeg; indien meerdere gewenscht worden, moet hiervoor betaald worden.

2°. Per band zullen niet meer dan 20 cliché's opgenomen worden.

3°. De omslagen der afdrucken mogen in wit kaft geleverd worden.

4°. De band zal uit 20 vel bestaan.

5°. De portokosten voor „Antonie van Leeuwenhoek" zijn voor rekening der vereeniging.

6°. De prijs van het tijdschrift in abonnement, thans f 8.50 mag door den uitgever verhoogd worden.

Ongeacht deze tegemoetkomingen, acht derhalve de uitgever, blijkens den brief van 10 Juni een prijs van f 10 per lid voor het tijdschrift noodzakelijk. De contributie per lid zou dan tot f 12.50 verhoogd moeten worden.

Prof. J. Smit vraagt waarom de exploitatie van het tijdschrift zoo duur moet zijn, waarop het echter moeilijk is te antwoorden, daar geen onkosten van drukken, enz. bekend zijn. Prof. van Oyen constateert, dat de vereeniging *niet* in haar bestaan bedreigd wordt door het ontbreken van een tijdschrift. Hij stelt voor het tijdschrift *tijdelijk* op te heffen, de vereeniging kan in dien tijd groeien en later, indien het ledental grooter is geworden, weer met een tijdschrift beginnen. In den tusschenliggenden tijd zouden de leden overdrukken van hun voordrachten in andere tijdschriften kunnen distribueeren en aldus het contact tusschen de leden continueeren. De heer van Nederveen licht de overeenkomst met de firma Swets toe en deelt mee, dat voor een contributieverhoging tot f 12.50 de statuten gewijzigd moeten worden. In 1934 is besloten tot het uitgeven van een eigen orgaan, terwijl in 1935 voorgesteld is het lidmaatschap van f 10 op f 9 te brengen. De heer A. Tasman stelt voor naar een anderen uitgever te gaan; de uitgever van het Militair Geneeskundig

Tijdschrift moet zeer billijk zijn; zijns inziens zouden we met eenvoudiger uitgave, b.v. van papier toe kunnen; hij stelt tevens voor de vrije lunch te laten vervallen. De Voorzitter deelt daarop mee, dat wanneer we opnieuw bij een anderen drukker zouden komen, ook het tijdschrift weer van naam zou moeten veranderen, daar men anders in moeilijkheden komt. Prof. Kluyver bevestigt dit en deelt mee, dat dit een onderlinge overeenkomst van uitgevers is. Freule v. Riemsdijk zou hiervoor een advocaat willen raadplegen, indien dat noodig was.

Prof. de Graaff begint met op te merken, dat de redactie geheel neutraal tegenover de kwestie staat; persoonlijk heeft het hem steeds gespeten, dat we indertijd Stenfert Kroese's Maatschappij hebben verlaten; principieel zijn er twee fouten gemaakt, nl. ten eerste de contributieverlaging en ten tweede het verlaten der firma v. Doesburgh. Ook deze firma legde geld op het tijdschrift toe. Vervolgens deelt hij verschillende moeilijkheden der redactie mee; o.a. drukproeven worden te lang gehouden, er is te weinig copy, samenwerking met andere vereenigingen stuit steeds op moeilijkheden. Het is hem steeds om de zaak te doen geweest, doch medewerking was meestal schaars. Hij wijst er op, dat overdrukken ook betaald moeten worden. Volgens hem is een tijdschrift het behoud der vereeniging.

De Voorzitter vraagt nu, wat de leden willen, daar een beslissing niet lang meer kan uitgesteld worden. Freule v. Riemsdijk wil toch trachten samenwerking met andere vereenigingen te krijgen, bijv. die der Biochemie; ze vindt ook het tijdschrift te luxueus, reproducties op apart papier is nergens voor noodig. De heer Julius hoopt, dat deel V nog volledig zal verschijnen. De heer den Dooren de Jong merkt op, dat er groote bezwaren bestaan, al zou het ook tijdelijk zijn, tegen het overdrukjes-systeem. Volgens hem weigeren sommige Deutsche tijdschriften, zelfs tegen betaling, overdrukken tot een ongelimiteerd aantal.

De Voorzitter constateert, dat de vergadering in 't algemeen is *tegen* de opheffing van het tijdschrift. Vervolgens vraagt prof. Smit het woord. Persoonlijk vindt hij, dat de geringe verhooging der moeilijkheden te riskeeren. Door een slechtere uitgave zou de contributie tot f 12.50 niet beslissend moet zijn om alle genoemde „standing” van het tijdschrift achteruit gaan. Hij wil er alles aan doen, het tijdschrift te continueeren, doch is van meening, dat de vrije lunch moet vervallen; bij elke, hem bekende, vereeniging wordt

de lunch persoonlijk betaald. De thuisblijvers betalen ook aan de lunch mee, hetgeen onbillijk is.

Na eenige discussie wordt tenslotte besloten: 1°. met ingang 1939 de contributie weer tot f 10 te verhoogen; 2°. de vrije lunch te laten vervallen; 3°. tot begin Mei den toestand aldus te laten; 4°. in den tusschentijd, begin 1939 of vroeger een aparte vergadering te beleggen ter bespreking over het tijdschrift of een commissie te benoemen (waar vele leden vóór zijn), die alle mogelijkheden nog eens grondig kan nagaan.

In het wetenschappelijk gedeelte spreekt Mej. F. Westendorp Boerma over: Onderzoekingen in verband met de verdeeling der agglutinenen over de serumeiwitten. Deze voordracht wordt in dit nummer opgenomen.

Bij de discussie vraagt de heer Tasman of de sera zonder conserveermiddel zijn gebruikt, daar er anders moeilijkheden kunnen ontstaan; spreekster beantwoordt dit bevestigend. Verder merkt hij op, dat er tusschen eu- en pseudoglobulinen alleen een fictief onderscheid bestaat; de antitoxinen zijn over een kleine fractie der sera-eiwitten verdeeld in tegenstelling met de agglutinenen. Hij vindt de eiwitbepalingen door uitwasschen na precipitatie en wegen van het kroesje een ouderwetsche methode; hij analyseert het filtraat door Kjeldahlbepalingen.

Mej. Boerma antwoordt daarop, dat inderdaad, zoodra de globulinen neerslaan, de agglutinatietiter daalt; Kjeldahlbepalingen hebben het bezwaar van den vermenigvuldigingsfactor, welke wisselt voor verschillende eiwitten. Tevens hebben ultracentrifugebepalingen wel degelijk verschil tusschen globulinen en albuminen aangetoond.

Op een vraag van prof. Smit of inplaats van ammoniumsulfaat ook zinksulfaat gebruikt kan worden (men behoeft dan niet zoo angstvallig voor de Kjeldahlbepalingen het ammoniumsulfaat uit te wasschen), antwoordt juffrouw Boerma, dat daartoe steeds ammoniumsulfaat gebruikt wordt.

De heer v. d. Hoeden merkt op, dat urine van leptospiralijsers wel agglutinenen kan bevatten, doch geen eiwit. Mej. Boerma antwoordt, dat slechts een spoor eiwit noodig is, chemisch niet aantoonbaar en daaraan vermoedelijk de agglutinenen zijn gebonden. Prof. Flu merkt naar aanleiding van de mededeeling van den heer v. d. Hoeden op, dat bij leptospiralijsers dikwijls de titer van het

bloedserum en van de urine gelijk oploopt. Prof. G. Kapsenberg geeft daarna een demonstratie van apparaten voor automatisch filteren, uitwasschen en extraheeren.

Na deze demonstratie merkt Freule van Riemsdijk op, dat ze 10 jaren geleden reeds een dergelijk soort toestel geconstrueerd heeft om kleurstof uit alcohol te halen. Prof. Kapsenberg zal dit vermelden. De heer Weber teekent daarop een toestel, kortgeleden in 't Chemisch Weekblad gepubliceerd, dat dezelfde functie verricht, waarop prof. de Graaff vermeldt, dat er in de Pharmacie reeds lang apparaten zijn voor automatische extractie, uitwasschen etc.

Na den koffiemaaltijd houdt prof. dr. P. C. Flu zijn voordracht over: Het Kation Mg^{++} en de lysis van Bac. megatherium door bacteriophag-megatherium. Deze voordracht wordt in dit nummer opgenomen.

De heer Tasman maakt de opmerking, dat het Mg-armmaken der vloeistof door toevoeging van Na-oxalaat, zijns inziens, weinig effect kan hebben, daar Mg-oxalaat niet zoo onoplosbaar is, wel het Ca-oxalaat. Prof. Flu antwoordt hierop, dat het terugdringen is der dissociatie door gelijke ionen. De heer den Dooren de Jong vraagt, waarom geen gebruik is gemaakt van kiezelzuurplaten, deze toch zijn goed uitwaschbaar en Mg-arm te krijgen. Prof. Kluyver deelt echter mee, dat agar minstens even gemakkelijk Mg-arm is te krijgen als kiezelzuurplaten.

W. A. L. Dekker, arts, houdt mede namens Dr. R. Th. Scholtens, een voordracht over: Het electrophoretisch gedrag van bacteriën als hulpmiddel bij de typendifferentiëring. Deze voordracht zal in het tijdschrift worden opgenomen.

Freule van Riemsdijk vraagt inlichtingen over de methodiek en prof. Kluyver vraagt of de afmetingen der bacteriën ook invloed kan hebben bij de kataphorese. Spreker antwoordt, dat in dit geval het verschijnsel onafhankelijk is van de afmeting der bacteriën. De heer Tasman had liever de electrophoretische proeven met levende bacteriën willen zien doen; de heer Rottier verneemt op zijn vraag, dat de ouderdom der bacteriën van weinig belang is. Mej. Ruys vraagt inlichtingen over 't bereiden van suspensies van typhusbacteriën zonder O en zonder Vi-antigeen. Het verschijnsel moet soort voor soort bepaald worden, in de vastgestelde soort kan men dan het type bepalen door het electrophoretisch gedrag.

Daarna spreekt Dr. A. Pondman over: Moeilijkheden bij bloed-groepbepalingen.

Op grond van een bloedgroepbepaling wordt de mogelijkheid besproken dat ook bloedgroep B evenals bloedgroep A in ondergroepen gesplitst gedacht moet worden. Hij meent te moeten aannemen, dat deze ondergroepeerings der B groep, zij het dan ook waarschijnlijk zeldzaam, bij bloedtransfusies moeilijkheden kan opleveren. Daarom legt hij er den nadruk op, dat bij bloedtransfusies, althans wanneer geen onmiddellijk ingrijpen noodzakelijk is, de bloedgroepbepalingen moeten geschieden zoowel ten opzichte van de agglutinogenen als van de agglutinenen.

Tenslotte meent hij, dat bij elke transfusie de directe proef, ondanks de voorafgaande bloedgroepbepalingen, nimmer mag ontbreken, daar deze proef in geval van een ondergroepeerings der bloedgroep, het gevaar dat daardoor aanwezig kan zijn, doet herkennen.

De heer Julius vraagt enkele inlichtingen over de vertoonde teekeningen, terwijl spreker den heer Schlemper mededeelt, dat bloedgroepbepalingen van ouders nog op het programma van onderzoek staan.

Tenslotte houdt Ir. G. W. Harmsen een voordracht over: Enkele mededeelingen over de discontinuïteit van de verdeeling der microben in den grond.

In 1935 las H. G. Thornton op het internationale congres voor Bodemkunde te Oxford een verhandeling van hemzelf en C. B. Taylor voor, over de „Short-Period Fluctuations in Bacterial Numbers in Soil”¹⁾.

Daarin berichtten zij over proeven, waarbij zij binnen zéér korte tijds-bestekken van slechts één à twee uur groote fluktuaties in het aantal bacteriën in den grond hebben gevonden. Zij hebben de bacteriën geteld zoowel met behulp van de z.g. plaatmethode als ook direct in gekleurde grondsuspensies. In beide gevallen vonden zij zeer sterke schommelingen van soms meer dan 50%. Een verklaring voor dit opmerkelijke verschijnsel konden zij weliswaar niet geven, zij constateerden echter, dat het zeer algemeen is, en blijkbaar niet afhankelijk is van uitwendige factoren, want zij vonden het zelfs in de bij volkomen gelijkmatige temperatuur en vochtigheid op het laboratorium bewaarde grondmonsters.

¹⁾ Pag. 175 van Transactions of the Third International Congress of Soil Science Oxford, England 1935.

Vol. 1, Commission Papers.

Dat was een interessante mededeeling met vergaande consequenties.

Bij nader toezien kan men echter een gegronnen twijfel aan de juistheid dezer waarneming niet onderdrukken. Zoo sterke schommelingen willen immers zeggen, dat zoowel de afsterving als ook de vermeerdering van de microben in den grond zeer snel moet verlopen; zóó snel, dat men uitgaande van de door Th. gegeven cijfers tot geheel absurde kwantiteiten van de omgezette organische stof moet komen.

Het leek dus gewenscht de proeven van Th. c.s. te herhalen en te verifiëren. Daarbij bleek al ras, dat dezelfde groote schommelingen ook optreden als men de parallel-monsters niet met bepaalde tijdsintervallen, doch tegelijk neemt. De schommelingen bleken dus niet een gevolg van werkelijke veranderingen in het aantal bacteriën te zijn, doch uitsluitend uit de techniek der monstername en der verwerking der monsters voor te spruiten.

Voortgezette onderzoekingen brachten n.l. aan het licht, dat het vooral het definitieve afwegen van een kleine hoeveelheid grond uit een groot, te velde genomen, monster is, die de fouten veroorzaakt. De verdeling der microben bleek in den grond zelfs op zeer kleine schaal, dus van kruimeltje tot kruimeltje, zoodanig ongelijkmatig te zijn, dat het bij zware, uit kluitjes en kruimeltjes bestaande, gronden niet mogelijk is een werkelijk representatieve hoeveelheid van een paar grammen af te wegen, zonder het groote monster eerst in zijn geheel op de een of andere wijze zeer fijn te verdeelen. Het suspendeeren in groote kogelmolens of het doorwrijven door een zeer fijne zeef bleken beiden uitvoerbaar te zijn en tot goede resultaten te leiden. Neemt men dezen voorzorgsmaatregel echter niet, dan moet men met zoo groote toevallige schommelingen rekenen, dat van het vaststellen van niet al te groote en opvallende reële verschillen in het aantal microben in den grond afgezien moet worden.

Om ongeveer halfvijf sluit de voorzitter met een woord van hartelijken dank aan den gastheer en de spreekster (sprekers) de goedbezochte vergadering.

De secretaris

T. FOLPMERS.

Het kation Mg^{++} en de lysis van *Bacterium megatherium* door den Bacteriophag antimegatherium

DOOR

PROF. DR. P. C. FLU.¹⁾

Bij een onderzoek naar het verloop der lysis van *Bacterium megatherium* door bacteriophag *megatherium* in de media van Uschinsky en Fraenkel, bleek mij het volgende:

Bacterium megatherium 899, de spontaan lysogene stam door den Dooren de Jong geïsoleerd, groeit goed in deze media. In Uschinsky echter beter en weelderiger dan in Fraenkel. In beide media wordt gedurende dezen groei de phaag gevormd ook nadat men zonder tusschenschakeling van andere media meermalen overgeënt heeft.

De stam *Bacterium megatherium* 338 die door mij lysogeen gemaakt is²⁾ groeit eveneens in beide media maar slechter in Fraenkel dan in Uschinsky. Terwijl door 338 bij groei in Uschinsky en talrijke overentingen in dit medium de phaag steeds gevormd wordt, is phaagvorming bij groei in Fraenkel gebrekkig. Reeds na enkele passages via dit medium is de phaag meestal niet meer door de lysis in vloeibaar milieu aan te toonen. Soms kan men in zulke gevallen door onderzoek van het medium op plagevorming de aanwezigheid van den phaag nog constateeren.

Een duidelijk verschil der media treedt op wanneer men de lysis van *Bacterium megatherium* 338 lysabel door bacteriophag *megatherium*, in Uschinsky en Fraenkel laat verlopen. Terwijl de lysis in Uschinsky goed verloopt en bij serieëntingen de phaag zich blijft vermeerderen, verloopt de lysis in Fraenkel slecht, om meestal

¹⁾ Voordracht gehouden op de vergadering van de Ned. Ver. v. Microbiologie op 12 November 1938.

²⁾ P. C. Flu. Zentralbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. Bd. 120. 1931. S. 1—15.

reeds na de eerste, soms pas na de tweede, maar steeds na de derde transmissie uit te blijven. Zooals een onderzoek leert verdwijnt de phaag uit het milieu.

De samenstelling van Uschinsky en Fraenkel bij mijn proeven gebruikt volgt hieronder:

Uschinsky: Magnesium sulfaat	0.2 gr	
Calcium chloride	0.1 gr	
Natrium asparagine	3.4 gr	
Ammonium lactaat	6.- cc	pH = 7.5
Sec. kalium fosphaat	2.- gr	
Natrium chloride	5.- gr	
Glycerine	30.- cc	
Aq. dest. ad	1000.- cc	
Fraenkel: Phosph. natr.	2.- gr	
Amm. lactaat	6.- gr	pH = 7.5
Asparagine	4.- gr	
Aq. dest. ad	1000.- cc	

Het milieu van Fraenkel verschilt dus van dat van Uschinsky door het gemis van glycerine en de armoede aan zouten.

Stassano en Beaufort¹⁾ en later Bordet²⁾ en Bordet en Renaux³⁾ hebben gewezen op het feit, dat de lysis bij sommige bacteriophagen bij afwezigheid van het calcium-ion niet optreedt en Bordet toonde bovendien nog aan, dat lysogene stammen ook in een calciumvrij-milieu den phaag blijven vormen. Zij vonden echter dat de door deze stammen geproduceerden phaag niet in staat is, in een calciumvrij milieu gevoelige bacteriënstammen op te lossen. Bordet meent hierin een bewijs te zien voor zijn opvatting dat de phaag een product is der microbe. Bordet en Renaux zeggen toch: „l'aptitude à produire ce principe (de bacteriophag) est inscrite dans la trame du microbe, elle est inhérente à sa physiologie”⁴⁾.

De synthetische milieus van Fraenkel en Uschinsky boden nu een uitstekend middel te onderzoeken of inderdaad het Ca^{++} ook

¹⁾ H. Stassano et A. G. de Beaufort. C. R. Hebd. d. l. Soc. d. Biol. Tome 93. p. 1380, 1925.

²⁾ J. Bordet. C. R. Hebd. d.l. Soc. d. Biol. Tome 94, p. 403, 1925.

³⁾ J. Bordet en E. Renaux. Ann. d. l'Inst. Past. 42 Année. No. 11, 1928. p. 1283—1335.

⁴⁾ p. 1320 l.c.

bij de lysis van megatherium de rol speelde, die het volgens B o r d e t zou vervullen bij de lysis van *Bacterium shiga*, door den phaag, geproduceerd door den lysogenen *Bacterium coli* van C a r è r e en L i s b o n n e¹⁾.

Bij een onderzoek was mij gebleken dat ook in den oxalaat-bouillon van B o r d e t (gewone bouillon Martin met 10/100 natrium-oxalaat) *Bacterium megatherium* 899 na meer dan 20 transmissies ongestoord en evengoed phaag produceerde als in gewonen bouillon. Ook de door mij lysogeen gemaakte stam deed dit, maar de plagues waren zoo klein dat men ze slechts bij gebruik van de loupe duidelijk kon zien. Volkomen in overeenstemming met hetgeen door B o r d e t en R e n a u x gevonden was bleek nu, dat in oxalaat-bouillon de lysis van de sensibele *Bacterium megatherium* 338 door den phaag van megatherium uitbleef en dat reeds na de vierde enting in serie de phaag geheel uit de filtraten verdween.

U s c h i n s k y en F r a e n k e l met of zonder $MgSO_4$ of $CaCl_2$ werden met *Bacterium megatherium* 338 sensibel en met 0.2 ccm van een suspensie van Bacteriophag megatherium geënt. De phaagsuspensie verkreeg ik door een 20 uur ouden stam van *Bacterium megatherium* 899 lysogeen te suspendeeren in aqua destillata en de suspensie door een kaars van Chamberland L_3 te filtreren.

Na 16 uur verblijf bij 37° C werd de inhoud der buisjes gefiltreerd en het filtraat op dezelfde wijze onderzocht. Daar mij bekend was, dat bij filtratie van suspensies van bacteriophagen in zoutoplossingen door kaarsen van Chamberland L_3 de phaag wordt geadsorbeerd, werd vóór de filtratie het synthetisch milieu met $1/10$ van het volumen aan bouillon gemengd. 0.1 ccm van het filtraat werd dan uitgespreid op een peptonagarplaat, bestreken met 338 sensibel en de gevormde plagues met behulp van den telpijp geteld. Het resultaat ziet men in tabel 1.

Een herhaling van dit onderzoek leverde met kleine variaties steeds weer hetzelfde resultaat, n.l. dat in een milieu waarin het Mg^{++} ontbrak de phaag van megatherium niet in staat was de sensibele megatherium 338 op te lossen en dat de phaag bij transmissie der filtraten verdween.

Het Ca^{++} speelde niet alleen geen rol bij de lysis maar scheen deze zelfs ongunstig te beïnvloeden. Een nader onderzoek naar de minimum hoeveelheden $MgSO_4$ die bij een Ca^{++} en Mg^{++} vrij voe-

¹⁾ C. R. d.l. Soc. d. Biol. 1923, Tome 88, p. 724.

Tabel I.

DE INVLOED VAN MgSO_4 OP HET VERLOOP DER LYSIS EN PLAGE-VORMING VAN MEGATHERIUM DOOR DEN PHAAG.

Aard van het milieu waarin de lysis van *Bacterium megatherium* 338 sensibel door bacteriophag megatherium moest verlopen.

Uschinsky	Uschin-sky + MgSO_4 — CaCl_2	Uschin-sky + CaCl_2 — MgSO_4	Uschin-sky — CaCl_2 — MgSO_4	Fraenkel	Fraenkel + MgSO_4	Fraenkel + CaCl_2
1e overenting ∞	∞	20	20	25	∞	85
2e „ ∞	∞	0	0	0	∞	0
3e „ ∞	∞	0	0	0	∞	0

0 = geen plages.

∞ = volkomen opvreting van de microbenlaag.

dingsmedium als Fraenkel moeten worden gevoegd om dit voor het verloop der lysis geschikt te maken, leerde dat terwijl de lysis met 0.0005 N MgSO_4 volkomen was en ook bij transmissie's de phaag zich in milieus met deze op megatherium 338 vermeerderde, zoowel lysis als vermeerdering van den phaag bij 0.0001 N uitbleven.

Een minimum van 60 mgr. MgSO_4 per L. Fraenkel en ook per L. van andere milieus was voor het normaal verloop der lysis niet te ontberen.

Het verdere onderzoek leerde dat niet het anion maar het kation de specifieke rol speelde. Terwijl magnesium door geen der andere hierop onderzochte kationen (Co^{++} , Cu^{++} , Al^{+++} , Sr^{++} , Fe^{++} , Fe^{+++} , Cd^{++} , Ca^{++} , Ba^{++} , La^{++} , Ce^{++}) kon worden vervangen, verliep de lysis evengoed bij gebruik van MgCl_2 , MgJ_2 en MgC_2O_4 als bij het gebruik van MgSO_4 .

De invloed van het magnesiumoxalaat vroeg, in verband met het feit dat in oxalaatbouillon lysis van megatherium 338 uitblijft, een nadere analyse. Het was mij bij een onderzoek naar den invloed der anionen op in aq. destillata gesuspendeerde phagen gebleken, dat vooral het $\text{C}_2\text{O}_4^{--}$ zeer deletair voor den phaag was.

De invloed van het $\text{C}_2\text{O}_4^{--}$ werd onderzocht door bij 100 ccm van de normaaloplossingen van het zout in gedestilleerd water, zooveel van een suspensie van bacteriophag megatherium in gedestilleerd water (zie hierboven p. 76) te voegen tot er per 0.1 ccm

van de vloeistof ± 1000 phagen waren. Direct en nadat de vloeistoffen met phaag gedurende wisselende tijden bij 26°C gestaan hadden werd 0.1 ccm op phaag onderzocht, door 0.5 ccm van het mengsel te voegen bij 0.5 ccm van een suspensie van 20 uur oude sensibele megatherium 338 in bouillon. 0.2 ccm van dit mengsel (phaag + microbensuspensie) werd op, in petri-schalen uitgetogen peptonagar uitgespreid.

Het resultaat van een dergelijk onderzoek volgt hieronder:

Tabel II.

INVLOED VAN NATRIUMOXALAAT OP BACTERIOPHAAG
MEGATHERIUM.

Aard van de vloeistof die op den phaag inwerkte	Aantal phagen per 0.1 ccm na verblijf bij 36°C gedurende			
	0 uur	3 uur	6 uur	24 uur
Aq. destillata pH 7.2	1204	970	663	694
0.250 N. Na.oxalaat.....	1204	92	22	0
0.125 N. Na.oxalaat.....	1204	6	1	0
0.05 N. Na.oxalaat.....	1204	2	0	0
0.02 N. Na.oxalaat.....	1204	0	0	0
0.01 N. Na.oxalaat.....	1204	522	223	4

0.01 N. Na. oxalaat bevat 800 mgr. van het zout p. L. en deze concentratie heeft bij een inrichting van de proef als zoo juist beschreven een duidelijk waarneembaren schadelijken invloed op den phaag. De invloed is geheel te wijten aan het anion.

Het magnesiumoxalaat werkt ook in de meest geconcentreerde waterige oplossing die met dit zout mogelijk is n.l. 300 mgr. p. L. niet schadelijk op den phaag. Indien men als oplosmiddel de cultuurvloeistof van Fraenkel gebruikt blijkt integendeel dat de productie bevorderd wordt. (zie tabel III).

Door toevoeging van Na.oxalaat in de hoeveelheid van $10/100$ p. L. aan Fraenkel dat door mengen met magnesiumoxalaat geschikt is gemaakt voor de lysis, wordt het milieu voor hetzelfde ongeschikt. (zie tabel IV).

De ongunstige invloed van het aan Fraenkel + MgC_2O_4 toegevoegde Na.oxalaat is in overeenstemming met bekende chemische wetten, die leeren dat overmaat van Na.oxalaat het Mg^{++} uit de oplossing verdringt. Na toevoeging wordt de concentratie van Mg^{++} te klein.

Tabel III.

GUNSTIGE WERKING VAN MAGNESIUM OXALAAT OP DE LYSIS
VAN BACTERIOPHAAG MEGATHERIUM.

Aard van de vloeistof	Aantal phagen per 0.1 ccm		
	Direct	1e transmissie	2e transmissie
Fraenkel + 300 mgr. MgC_2O_4 + Meg. 338 Lysabel + phaag.	350	<u>5</u>	<u>5</u>
Fraenkel + 200 mgr. MgC_2O_4 + Meg. 338 Lysabel + phaag.	65	<u>5</u>	<u>5</u>
Fraenkel + 100 mgr. MgC_2O_4 + Meg. 338 Lysabel + phaag.	110	<u>5</u>	<u>5</u>
Fraenkel + 50 mgr. MgC_2O_4 + Meg. 338 Lysabel + phaag.	215	65	10
Fraenkel + 100 mgr. $MgSO_4$ + Meg. 338 Lysabel + phaag.	225	550	2
Fraenkel sec + Meg. 338 Lysabel + phaag.	345	70	0

Nog een punt wensch ik te behandelen vóór ik de conclusies resumeer die dit gedeelte van het onderzoek mij toestaat te trekken.

Een onderzoek leerde mij dat Fraenkel op hierin gesuspendeerde phaag niet schadelijk werkt. Toch ziet men bij filtraties van lysaten van megatherium 338 door phaag in Fraenkel, dat het aantal der phagen niet proportioneel aan de verdunning, die bij de transmissies plaats vindt, vermindert maar dat dit aantal reeds bij de eerste transmissie abrupt afneemt om bij de tweede transmissie tot 0 te dalen.

Tabel IV.

OPHEFFING DER GUNSTIGE WERKING VAN MgC_2O_4 OP DE PHAAG-
VORMING DOOR TOEVOEGING VAN $Na_2C_2O_4$.

Aard van het milieu	Aantal phagen in 0.1 ccm der vloeistof		
	Direct	Na de 1e transmissie	Na de 2e transmissie
Fraenkel + 300 mgr. $MgOx$ + $1\frac{0}{100}NaOx$ p.L.	360	570	0
„ + 200 „ „ + „ „ „	550	95	0
„ + 100 „ „ + „ „ „	570	85	0
„ + 50 „ „ + „ „ „	600	20	0
„ + 100 „ „	490	<u>5</u>	<u>5</u>

Het bleek mij dat dit verschijnsel moet worden toegeschreven aan de adsorptie van den phaag door de bacteriën. Deze adsorptie heeft zoowel door levende als door gedooide bacteriën, zoowel in media met als zonder magnesium plaats.

Ik kan uit het bovenstaande concluderen:

- a. dat van alle onderzochte kationen alleen het Mg^{++} voor de lysis van megatherium 338 lysosensibel door bacteriophaga megatherium onontbeerlijk is.
- b. dat door toevoeging van Na.oxalaat het Mg^{++} verdrongen wordt en niet meer als vrij kation werken kan.
- c. dat ook in een Mg-vrij milieu de sensibele 338 de phaag adsorbeert.

De lysis wordt ingeluid door adsorptie van den phaag door de gevoelige microben.

Zooals mij bleek is elke willekeurige microbe in staat phaag te adsorberen, ook wanneer de phaag niet in staat is de betreffende microbe op te lossen, maar de adsorptie door gevoelige microben is veel krachtiger en heeft soms, indien de adsorptie door gedooide sensibele microben geschiedt, een bijna geheel verdwijnen van den phaag ten gevolge.

In het geval van den bacteriophag van megatherium was voor de maximale adsorptie van den phaag door megatherium de aanwezigheid van het Mg^{++} geen vereischte.

Een poging om door een onderzoek een inzicht te verkrijgen in het meer intieme verband tusschen lysis en het Mg^{++} , mislukte. Voor dit experiment was het noodig over magnesiumvrijen agar te beschikken. Dit was mij mogelijk door toepassen van een methode door Prof. B u n g e n b e r g d e J o n g gebruikt ¹⁾).

Gewone agar-agar wordt fijn geknipt. Men overgiet den agar met gedestilleerd water en laat minstens een nacht in de ijskast staan. Daarna wordt het water afgegoten en vervangen door 10% NaCl oplossing. Er moet een overmaat der oplossing zijn zoodat de agar geheel bedekt wordt. Na weer een nacht staan in de ijskast wordt na afgieten van de NaCl oplossing de bewerking met 10% NaCl herhaald en dit 10 × na elkaar voortgezet. Daarna wordt de NaCl oplossing door gedestilleerd water vervangen en ook deze bewerking 10 × herhaald.

¹⁾ Academisch proefschrift, Utrecht.

Terwijl gewone agar $\pm 1/10\%$ magnesium bevat, kon Mejufrouw Dr. Steenhauer¹⁾ na toepassing van de zeer gevoelige micromethode met titaangeel in 3 gram van den aldus behandelde agar geen magnesium aantoonen.

Door 30 gram van dezen agar te mengen met 1 L. magnesiumvrijen Uschinsky verkreeg men een milieu waarop zowel megatherium 899, als megatherium 338 groeiden, zij het dan ook niet met een even dikke laag als op gewonen agar.

Zowel op dezen agar, als op agar bereid door gewonen agar met magnesiumvrijen Uschinsky te mengen, alsook op gewonen peptonagar, werd uitgestreken:

- a. Een mengsel van driemaal gewasschen Bacterium megatherium 338 sensibel en in magnesiumvrijen aq. destillata gesuspendeerde phaag tegen dezen sensibelen stam.
- b. Een mengsel van driemaal gewasschen Bacterium megatherium 338 die vooraf in staat was gesteld uit een $1/10\%$ oplossing van $MgSO_4$, Mg^{++} te adsorbeeren plus in aq. destillata gesuspendeerde phaag tegen dezen sensibelen stam.
- c. Een mengsel van driemaal gewasschen Bacterium megatherium 338 die vooraf in staat was gesteld Mg^{++} te adsorbeeren plus phaag gesuspendeerd in Uschinsky, die 300 mgr. Mg. Oxalaat p. L. bevatte.

Het aantal phagen dat hierbij op den agar per 0.1 ccm van de uitgespreide suspensie werd gebracht, was zoo groot dat het met behulp van de door mij toegepaste methode niet te tellen was.

Het resultaat was onveranderlijk hetzelfde n.l. dat zich *nooit* op den volkomen magnesiumvrijen agar plagues vormden. De bacterielaag groeide gelijkmatig.

In scherpe tegenstelling hiermee was op den gewonen agar met magnesiumvrijen Uschinsky en op den gewonen peptonagar de bacterielaag steeds door den phaag weggevreten.

Het bleek dus dat nòch aan bacteriën geadsorbeerd Mg^{++} , nòch Mg^{++} dat eventueel met de suspensievloeistof op den agar werd gebracht in staat was de lysis tot stand te doen komen op Mg-vrije vaste voedingsbodems, waarschijnlijk omdat de concentratie van het Mg^{++} na de verdeling der vloeistoffen over het

¹⁾ Conservatrice aan het Pharmaceutisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Leiden.

agaroppervlak te gering werd om lysis mogelijk te kunnen maken.

De analogie van de onontbeerlijkheid van het kation Mg^{++} voor de lysis door den phaag, met dat wat bekend is van de rol door verschillende kationen bij de werking van sommige fermenten gespeeld springt in het oog.

Voor sommige fermenten is het aangetoond of in hooge mate waarschijnlijk gemaakt, dat het kation met het ferment verbindingen vormt en de rol speelt van een co-ferment en dat aan de verbinding, ferment + co-ferment de functie van het ferment toekomt. Ferment noch co-ferment zijn in staat zelfstandig die functie uit te oefenen.

Bij andere fermenten moet de werking van het kation verklaard worden doordien het zich bindt met stoffen die anders remmend op de werking van het ferment zouden werken. In het geval van den door mij onderzochten phaag zou men kunnen veronderstellen dat het kation bij het binnendringen van den phaag in de microbe en de zich hierop aansluitende lysis een rol moet spelen.

Het resultaat mijner zoo juist meegedeelde onderzoekingen geeft aan deze veronderstelling geen steun. Wellicht is de invloed deze, dat het Mg^{++} zich met producten, die bij den groei van *Bacterium megatherium* ontstaan, bindt en zodoende de lysis van de microbe mogelijk maakt, maar een bewijs voor deze veronderstelling kan ik niet leveren.

Tenslotte wil ik nog het resultaat vermelden van proeven die genomen werden met het doel na te gaan of bij voortdurende passage van *Bacterium megatherium* 899 lysogeen en *Bacterium megatherium* 338 lysogeen, via magnesiumvrije vaste en vloeibare media, deze microben van den phaag kunnen worden gereinigd.

Hiertoe werden de genoemde microben twintigmaal achtereenvolgens overgeënt in *a.* Fraenkel; *b.* Uschinsky met 10/00 Na-oxalaat en *c.* op volkomen magnesiumvrijen agar.

Mej. Steenhauer was ook hierbij zoo vriendelijk mij te helpen en de voor de bereiding der synthetische milieus gebruikte chemicaliën op hun magnesiumgehalte te onderzoeken. Zij vond, dat in geen der gebruikte chemicaliën in die hoeveelheden waarin zij gebruikt werden, zelfs niet bij toepassing der titaangeel-micro-methode, magnesium kon worden gevonden, met uitzondering van het ammoniumlactaat waarbij magnesium in minimale hoeveelheden kon worden aangetoond.

Het bleek nu dat *Bacterium megatherium* 899, de spontaan lysogene stam op geen der zoo juist beschreven manieren van den phaag kan worden gezuiverd. Zelfs na 30 maal overenten op den volkomen magnesiumvrijen agar kan men door suspendeeren der microbenlaag en filtratie der suspensie den phaag aantoonen.

Bacterium megatherium 338 lysogeen gedroeg zich anders. Door overenting via Fraenkel en via den magnesiumvrijen agar gelukte het reeds na 10 overentingen, soms ook reeds na 8, de microben blijvend van den phaag te zuiveren.

In de Uschinsky die met 10/00 natriumoxalaat gemengd was bleef 338 ook na 20 overentingen phaag produceeren.

Bij het onderzoek naar de plagevorming bij gebruik van dit milieu, dat geschiedde door het filtraat van het lysaat uit te spreiden over met *Bacterium megatherium* 338 lysogeen bestreken gewonen schuin gestolden peptonagar, werd een merkwaardig gedrag van den phaag geconstateerd. Onderzocht men het filtraat van de 8e of 10e transmissie, dan zag men na 24 uur alleen dān plages indien men de dunne, het verst van het condenswater verwijderde deelen van den agar met de loupe onderzocht. Soms zag men maar enkele duidelijke plages. Liet men de buisjes 2 à 3 $\times$ 24 uur bij 25° C staan dan voltrok zich op dat deel van de cultuur, dat met het filtraat bevochtigd was, een verandering. De rand van het bevochtigde deel werd hoe langer hoe scherper afgeteekend en de microbenlaag binnen deze omlijning werd langzaam weggevreten, echter nooit volkomen. Ook na dagen staan was de in dikte verminderde microbenlaag duidelijk te zien. Bij onderzoek met de loupe vond men hierin talrijke uiterst kleine plages. Men krijgt den indruk, dat in het magnesium-arme vloeibare milieu quantitatief niet veel minder phagen gevormd worden dan in geschikt en magnesium bevattend milieu, maar dat wel de intensiteit der phaagwerking sterk verlaagd is. Het gelukte om na 4 passages van den in intensiviteit der werking teruggelooopen phaag via magnesiumoxalaat houdende Fraenkel (300 mgr. p. L.) de virulentie weer zoo op te voeren dat volkomen wegvreting der agarlaag werd verkregen en eventueele plages ook zonder loupe duidelijk te zien waren.

Ik moest, hoewel het onmogelijk is zeker te bewijzen dat er zich in de media bereid met magnesiumvrije bestanddeelen inderdaad geen magnesium kationen bevinden, besluiten dat *Bacterium megatherium* 899 lysogeen, ook in volkomen magnesiumvrij- of praktisch magnesiumvrij milieu, phaag kan doen ontstaan terwijl Bacte-

rium megatherium 338 lysogeen hiertoe nog minimale hoeveelheden Mg^{++} behoeft.

Hoewel Bacterium megatherium 899 lysogeen onder geen enkele inrichting van de proef in een magnesiumvrij milieu, het vermogen phaag te doen ontstaan, verloor, werd toch getracht deze microbe van den phaag te zuiveren. Hiertoe werd Bacterium megatherium 899 lysogeen $6 \times$ op magnesiumvrijen agar geënt. Voorzichtig werd, zonder den agar te raken, een lus der cultuurlaag in Fraenkel gebracht. In dichtgesmolten geheel in water gedompelde buisjes werd de suspensie gedurende een uur tot $80^{\circ} C$ verhit. Kleine en grootere platinalussen der suspensie kwamen in Fraenkel, in magnesiumvrijen Uschinsky en in bouillon. Alle geënte bouillonbuisjes vertoonden groei, maar van de Fraenkel en Uschinsky alleen diè buisjes, waarin zooveel van de verwarmde suspensie was gebracht, dat de vloeistof troebel werd. In buisjes waarin de sporen ontkiemden en de cultuur positief werd, kon steeds de phaag worden gevonden.

Bij deze proef bleek niet alleen dat Mg^{++} noodzakelijk is voor de totstandkoming des lysis van gevoelige megatherium door den megatherium-phaag, maar ook dat de groei van Bacterium megatherium er door bevorderd wordt. Ontkieming der sporen dezer microben heeft niet plaats in Mg^{++} vrij milieu, tenzij men groote hoeveelheden sporenhoudend materiaal in het Mg^{++} vrij medium ent.

Indien ik alleen Bacterium megatherium 899 lysogeen voor mijn onderzoek gebruikt had zou ik de opvatting van Bordet, dat de vorming van den phaag een physiologische functie is van de microbe en dat de phaag dus endogeen uit de microbe ontstaat, hebben bevestigd.

Nu ook voor Bacterium megatherium 338 die door mij kunstmatig lysogeen was gemaakt een gedrag, wel is waar verschillend in intensiteit der phaagvorming, maar dan toch overeenkomstig dat van 899, werd geconstateerd, kan het resultaat van mijn onderzoek geen steun geven aan Bordet's meening.

Wilde men ook voor megatherium 338 de verklaring zoeken in een physiologische functie dier microbe dan zou dit beteekenen dat het mij gelukt was de physiologische functie van den vooraf geen phaagleverende 338 door inwerking van den phaag zóó te hebben veranderd, dat deze wel phaag ging vormen. De physiologische

functie veranderen is een andere definitie voor het ziek maken der microbe. Men zou met meer recht kunnen volhouden dat ik de microbe door inwerking van den phaag ziek had gemaakt of op nog andere wijze uitgedrukt met den phaag geïnfecteerd had.

Zoo blijft ook nu het probleem, waarom de door mij onderzochte lysogene stammen voortgaan in magnesiumvrij milieu phaag te produceeren, terwijl de door hen geproduceerde phagen alleen maar in Mg^{++} houdend milieu zich kunnen vermeerderen, onopgelost.

Samenvatting en conclusies.

Er wordt bewezen dat de lysis van „*Bacterium megatherium*” lysabel door een bacteriophag antimegatherium alleen mogelijk is bij aanwezigheid van het kation Mg^{++} .

De minimum hoeveelheid welke noodig is komt overeen met een concentratie van ± 60 gr. $MgSO_4$ p. l. vloeistof of medium.

Het kation Mg^{++} is door geen der andere twee of meerwaardige kationen te vervangen.

Voor de productie van den bacteriophag door den lysogenen stam *Bacterium megatherium* 899 (den Dooren de Jong) is het magnesium of niet noodig, of is de aanwezigheid van zich aan de opsporing onttrekkende hoeveelheden voldoende.

De kunstmatig lysogeen gemaakte stam „*Bacterium megatherium* 338” neemt een plaats in tusschen deze uitersten. Op een vast milieu dat magnesiumvrij is gemaakt kan de phaag niet door deze microbe worden geproduceerd, wel in een vooraf magnesium bevattend vloeibaar milieu dat door toevoeging van 1% natrium oxalaat magnesium-arm is gemaakt.

Een verklaring van de rol door het Mg^{++} bij de lysis gespeeld kan niet worden gegeven.

Het door mij geconstateerde feit dat een kunstmatig lysogeen gemaakte stam in een practisch magnesiumvrij milieu toch phaag blijft produceeren, maakt het onwaarschijnlijk, dat de verklaring van Bordet voor een analoog gedrag ten opzichte van calcium bij door hem onderzochte lysogene stammen gegeven, volgens welke de productie van phaag een physiologisch verschijnsel zou zijn van die lysogene stemmen, juist is.

Over de verdeling van de agglutinen over de serumeiwitten ¹⁾.

DOOR

F. WESTENDORP BOERMA, Chem. dr^a, assistente.

Dat de verschillende antilichamen ten nauwste met de serumeiwitten samenhangen, was al heel spoedig na hun ontdekking, in het laatst van de vorige eeuw, bekend. Worden uit een immuun-serum de eiwitten verwijderd, dan verdwijnen eveneens de antilichamen.

Onderzoekingen over het verband tusschen serumeiwitten en antilichamen zijn in een zeer groot aantal verricht, wat wel samenhangt met het groote belang van deze kwestie voor de zgn. „zuivering” van sera voor therapeutische doeleinden, waarbij men streeft naar een hooge concentratie aan antilichamen bij zoo weinig mogelijk eiwit. De antilichamen zijn n.l. niet verdeeld over het totale serumeiwit, dat gewoonlijk verondersteld wordt te bestaan uit globuline en albumine, maar zij bevinden zich alleen in het globuline.

Maar ook van theoretisch standpunt is de vraag naar de verhouding van de antilichamen tot de serumeiwitten van groote beteekenis, o.a. ten aanzien van het wezen der antilichamen.

Het nauwe verband, dat er bestaat tusschen globuline en antilichamen blijkt wel hieruit, dat het niet gelukt is om antilichamen te isoleeren, zonder dat tevens eiwit aanwezig is. Het lijkt waarschijnlijk, dat de antilichamen zelf als eiwitten opgevat moeten worden. Misschien onderscheiden zij zich van het normale globuline alleen door het bezit van een bepaalde groep of een bepaalde structuur, waardoor zij specifiek kunnen reageeren met het homologe antigeen. Men kan zich ook voorstellen, dat antilichamen geen proteïnen zijn, dat zij echter een zeer groote affiniteit voor globuline hebben en zich hier direct na hun vorming aan binden. De

¹⁾ Voordracht voor de Vergadering van de Ned. Ver. v. Microbiologie, gehouden te Utrecht op 12 November 1938. Uitvoerige publicatie met literatuur volgt in den vorm van een dissertatie.

meeste onderzoekers huldigen echter tegenwoordig wel de eerste opvatting.

De door mij verrichte proeven hebben alleen betrekking op agglutinin en zijn een voortzetting en uitbreiding van vroegere, door Mej. Dr. T. H. E. R i s p e n s in het laboratorium van den Gemeentelijken Gezondheidsdienst in Groningen, die destijds stond onder leiding van Dr. G. K a p s e n b e r g, verrichte proeven. Bij deze onderzoekingen werd o.a. nagegaan of de agglutinin gelijkmatig over het totale globuline verdeeld zijn, of dat slechts een bepaalde fractie voor het agglutineerende vermogen verantwoordelijk is. De oudere literatuur geeft zeer tegenstrijdige resultaten.

Door R i s p e n s werd in de eerste plaats uit sera van konijnen en paarden, die agglutineerend werkten op typhus- en paratyphusbacillen, het globuline afgescheiden door half-verzadigen met ammoniumsulfaat. Dit globuline werd afgecentrifugeerd en daarna opgelost tot hetzelfde volume als het oorspronkelijke serum. Het agglutineerende vermogen van deze oplossingen werd vergeleken met dat van het volledige serum. Het bleek, dat de eindtiters van serum en globuline dezelfde waren, zoodat noch de verwijdering van het albumine, noch de behandeling met ammoniumsulfaat, schade doet aan de agglutinatie.

Nu wordt veelal aangenomen, dat het globuline niet een homogeen eiwit is, maar dat het uit tenminste twee verschillende fracties bestaat. Wordt het n.l. door dialyse bevrijd van zouten, dan slaat een gedeelte van het globuline neer; dit is dus in zoutvrij water onoplosbaar en wordt euglobuline genoemd. Het in oplossing blijvende eiwit noemt men pseudoglobuline. Ook door $\frac{1}{3}$ -verzadigen met ammoniumsulfaat, door behandelen met koolzuur, azijnzuur, verdund zoutzuur, enz. zou een scheiding tusschen eu- en pseudoglobuline teweeggebracht kunnen worden.

Om na te gaan, of de agglutinin misschien in hoofdzaak in één van deze beide fracties gelocaliseerd waren, werd door R i s p e n s op verschillende manieren het eu- en pseudoglobuline van elkander gescheiden. Beide eiwitten werden steeds opgelost tot het oorspronkelijke serumvolume en de agglutineerende werking werd vergeleken met die van het totale globuline, soms ook tevens met die van het volledige serum. Het bleek, dat steeds beide fracties positief reageerden, de euglobulineoplossing echter veel zwakker dan de pseudoglobulineoplossing. Het lag voor de hand om dit verschil in verband te brengen met het verschil in eiwitgehalte van de onder-

zochte oplossingen. De hoeveelheid euglobuline is steeds veel geringer dan de hoeveelheid pseudoglobuline. Wil men een juist beeld verkrijgen van het agglutineerende vermogen van eu- en pseudoglobuline, dan moet het eiwitgehalte van beide oplossingen gelijk zijn. Van de eu- en pseudoglobulineoplossingen werd daarom door *R i s p e n s* het eiwitgehalte bepaald, en vervolgens werden deze oplossingen zóódanig verdund, dat het eiwitgehalte onderling gelijk was en tevens overeenkwam met het totale globulinegehalte van het serum, in een bepaalde verhouding verdund.

De eindtiter van de eu-, pseudo- en totaal-globulineoplossing was nu vrijwel dezelfde. Soms agglutineerde het euglobuline minder ver, wat toegeschreven werd aan technische fouten. Er is dus, wat het gehalte aan agglutinenen betreft, geen reden voor de opvatting, dat eu- en pseudoglobuline verschillende eiwitten zijn.

Het is echter ook uit chemisch oogpunt zeer de vraag, of de onderscheiding in eu- en pseudoglobuline reden van bestaan heeft. Er tegen pleit, dat men met verschillende methoden zeer verschillende hoeveelheden euglobuline verkrijgt. Bovendien werd geen overtuigend verschil in chemische samenstelling gevonden; beide eiwitten zijn uit dezelfde aminozuren opgebouwd. Het meest kenmerkende verschil is eigenlijk, dat euglobuline, althans, wanneer dit verkregen is door dialyse, onoplosbaar is in zoutvrij water.

Ik heb mij nu afgevraagd, of door uitzouting werkelijk een scheiding van verschillende eiwitten mogelijk is. Bestaat er een min of meer duidelijke zone tusschen het neerslaan van eu- en pseudoglobuline en ook tusschen het neerslaan van globuline en albumine? Een gedeeltelijk antwoord op deze vraag vond ik in het werk van *Thor Jørgensen*, die van verschillende sera uitzoutingscurven gemaakt heeft. Hij voegde aan constante hoeveelheden serum opklimmende hoeveelheden ammoniumsulfaat toe en bepaalde, na afcentrifugeeren van de neerslagen, het eiwitgehalte van de overblijvende vloeistoffen. Van de uitkomsten werden curven gemaakt. Het bleek nu, dat bij normaal paardenserum het eiwitgehalte van de oplossingen regelmatig daalde, naarmate de ammoniumsulfaat-concentratie toenam. Van 50 tot 52% verzadiging met ammoniumsulfaat bleef het eiwitgehalte constant, om vervolgens weer af te nemen. Tusschen 50 en 52% zou dus de grens liggen tusschen globuline en albumine. Bij sera van konijnen daalde het eiwitgehalte voortdurend; bij 54% verzadigen vertoonde de eiwitcurve een scherp knik, wat er op zou wijzen, dat hier albumine begint neer

te slaan, hoewel men niet met zekerheid kan zeggen, dat nu al het globuline uit het serum verdwenen is. Daar de uitzouting pas bij $\pm 40\%$ verzadigen met ammoniumsulfaat begonnen werd, was over het bestaan van eu- en pseudoglobuline uit deze curven niets op te maken.

Ik heb deze proeven daarom uitvoerig herhaald en een eenigszins andere techniek toegepast. In een groot aantal buizen werd 2 cc serum gebracht en hieraan werden opklimmende hoeveelheden van een verzadigde ammoniumsulfaatoplossing toegevoegd, zóódanig, dat de verzadiging gewoonlijk opliep van 26—72%. Het totale volume in iedere buis bedroeg steeds 20 cc. Na affiltreeren van de neerslagen, werd van de filtraten 10 cc gecoaguleerd. Het gecoaguleerde eiwit werd gefiltreerd en automatisch uitgewasschen met een, voor dit doel door Prof. G. K a p s e n b e r g geconstrueerde apparatuur.

Het resultaat vindt men in curve 1 en 2, resp. normaal konijnen- en paardenserum.

De eiwitcurve van het konijnenserum daalt regelmatig tot een verzadiging van $\pm 54\%$, loopt van 54 tot 60% min of meer horizontaal, om vervolgens sterk te dalen. Waarschijnlijk slaat dus beneden 54% in hoofdzaak globuline neer, boven 60% in hoofdzaak albumine. Bij het paardenserum daalt de curve voortdurend, zoodat het neerslaan van globuline geleidelijk in een neerslaan van albumine overgaat. *Zoowel bij het paarden- als bij het konijnenserum is in de curve geen aanwijzing te zien voor het bestaan van eu- en pseudoglobuline.*

Eveneens werden curven gemaakt van *immuunserum* van konijnen en paarden. De konijnen waren geïmmuniseerd met typhus-resp. proteusbacillen, het paardenserum werkte agglutineerend met *S. suipestifer*. Curven 3, 4 en 5.

Bij de konijnensera is het globulinegehalte iets toegenomen, het albuminegehalte overeenkomstig verminderd. Een min of meer horizontaal gedeelte is in de curve niet meer aanwezig. Veel grooter is het verschil tusschen de curven voor normaal en immuun paardenserum. Bij het immuunserum is de hoeveelheid globuline sterk toegenomen. Men krijgt den indruk, dat in het serum slechts zeer weinig albumine aanwezig is. De curven zijn, wat de vermeerdering van het globuline betreft, dus volkomen in overeenstemming met de ervaring, volgens welke bij immunisering, en ook onder pathologische omstandigheden, het globulinegehalte van het serum stijgt.

Een min of meer duidelijke grens tusschen het neerslaan van beide eiwitten is niet aanwezig. Er is geen reden om aan te nemen, dat juist door 50% verzadigen al het globuline uit het serum verdwenen is.

Behalve het eiwitgehalte, werd van de filtraten ook de agglutinatietiter bepaald. De loop van de agglutinatie is in de curven door een stippellijn aangegeven. Daar het niet mogelijk is om den titer nauwkeurig te bepalen, geven de agglutinatiecurven slechts een vrij ruw beeld. Men ziet evenwel, dat de agglutinatie vermindert, zoodra eenig globuline is neergeslagen, en nul wordt bij een verzadiging van 46—50%.

De in de curven 3, 4 en 5 aangebrachte agglutinatiecurven geven geen juist beeld van de verhouding tusschen agglutinatie en hoeveelheid aanwezig werkzaam globuline. Om deze verhouding duidelijker in het licht te stellen, moet de agglutinatiecurve geplaatst worden tegenover dat gedeelte van de geheele eiwitcurve, hetwelk betrekking heeft op het *actieve* eiwit, m. a. w. tegenover de curve, waarvan het gedeelte na de verzadiging tot 50% weggelaten is. Het aldus verkregen resultaat is in de curven 6, 7 en 8 weergegeven.¹⁾ Zonder hier op bijzonderheden in te gaan, kan uit deze curven afgeleid worden, dat de hoeveelheid agglutineerend globuline in elke fractie vrijwel dezelfde is.

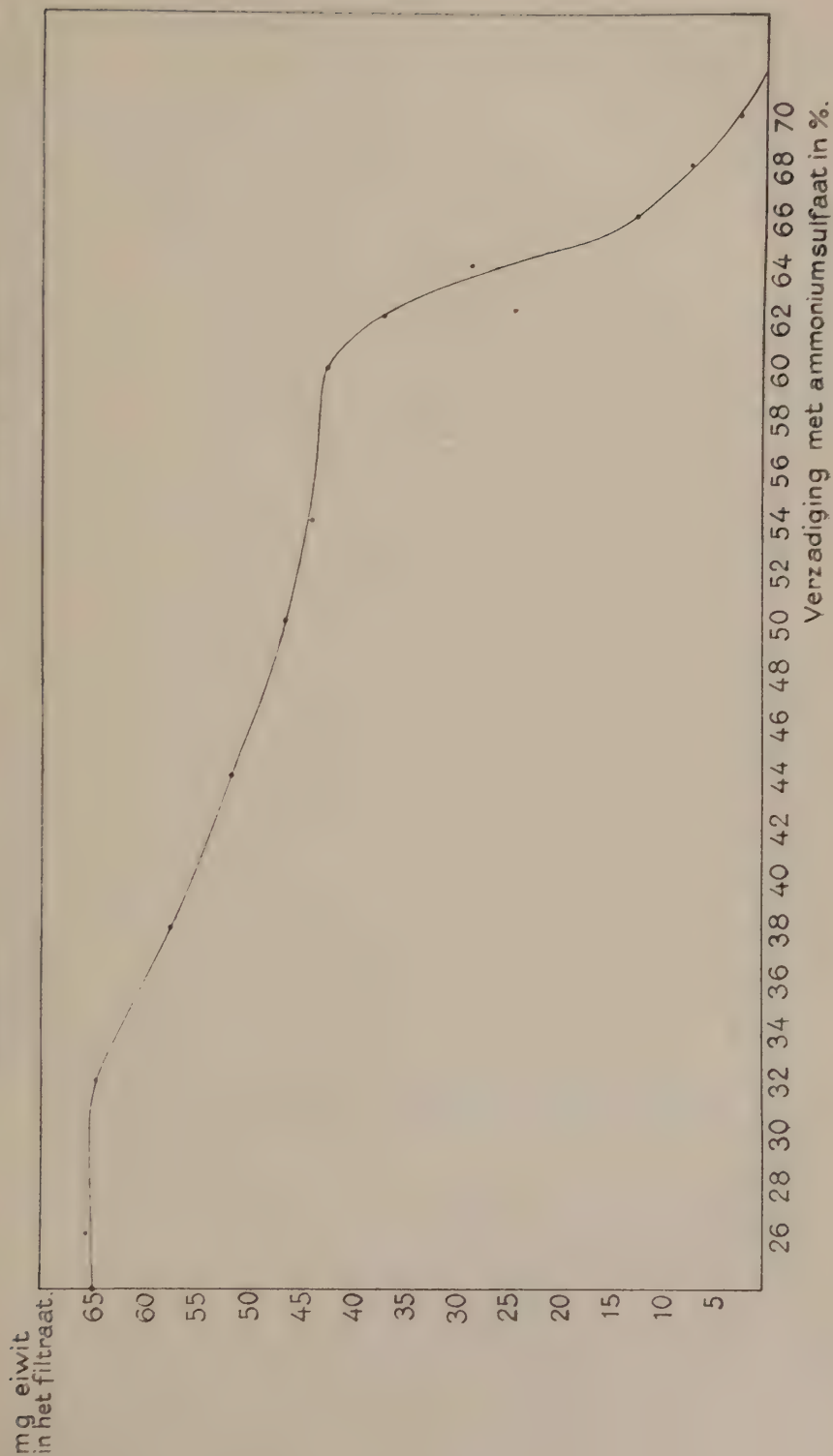
Om nu den, door de curven 6, 7 en 8 gevestigden, indruk op zijn juistheid te toetsen, om dus na te gaan of de agglutinen gelijkmatig over de verschillende, beneden 50% neerslaande, globulinefracties verdeeld zijn, werden aparte fracties geïsoleerd en op gelijk eiwitgehalte gebracht, waarna de agglutinatietiter bepaald werd. Het resultaat wordt weergegeven door de tabellen 1, 2 en 3.

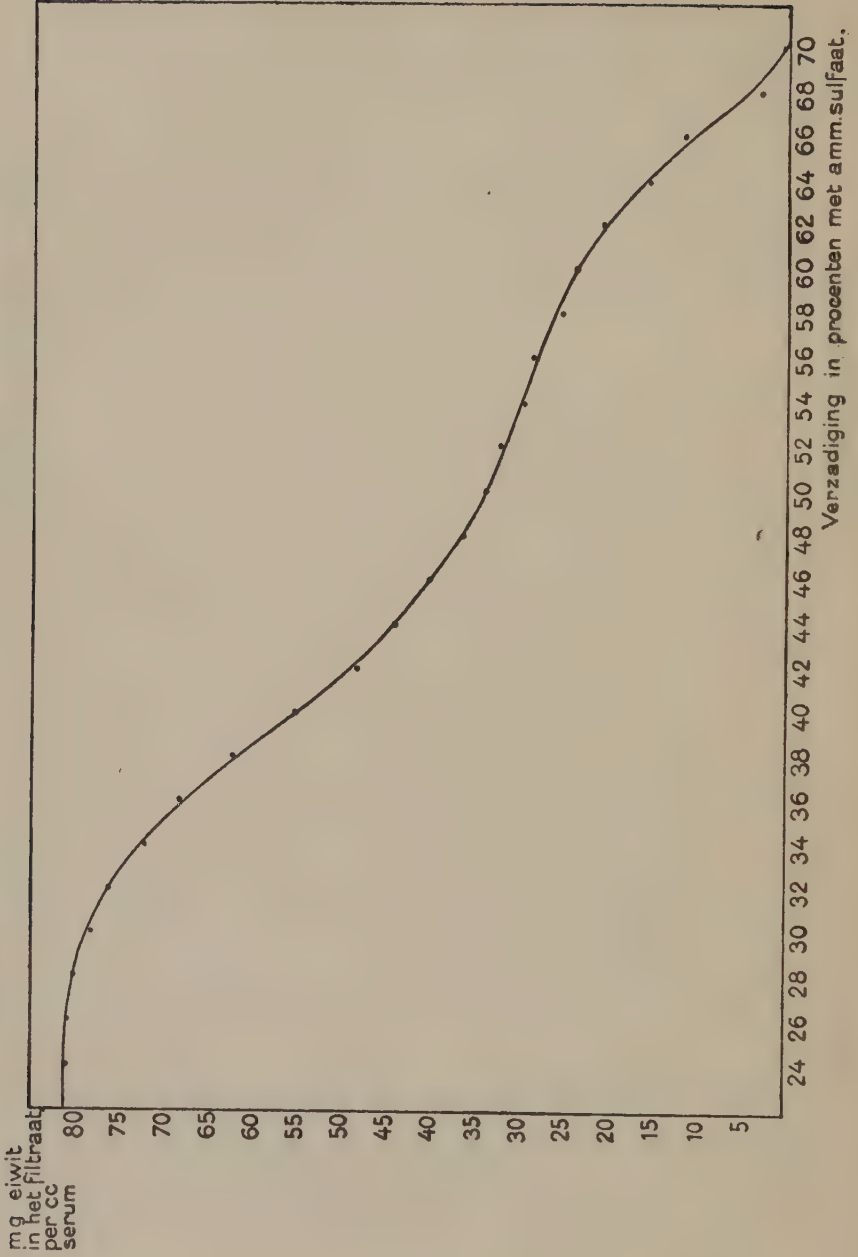
Over het geheel werd gevonden, dat de overeenstemming tusschen de verschillende fracties bij konijnenserum beter was dan bij paardenserum.

In ieder geval is het duidelijk, dat *elke* hoeveelheid globuline, die neerslaat beneden 46 à 50% verzadiging met ammoniumsulfaat, agglutinen bevat, *zoodat het niet mogelijk is om met behulp van ammoniumsulfaat een bepaalde globulinefractie te isoleren, waarin de hoofdmassa van de agglutinen aanwezig is.*

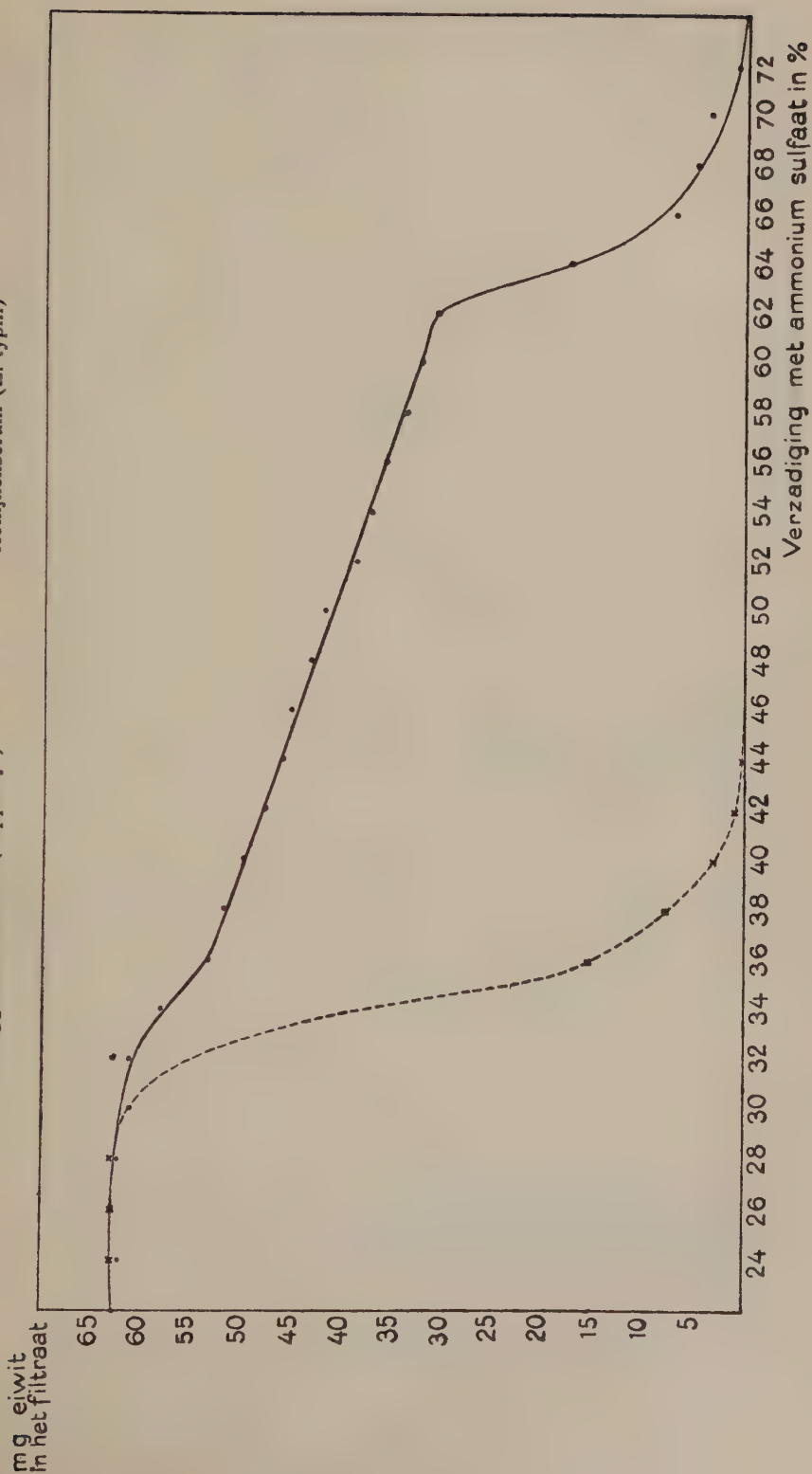
¹⁾ In deze curven wordt met eiwit actief eiwit bedoeld.

Curve 1
Eiwitcurve
Normaal konijnsersum



Curve 2
Eiwitcurve
Normaal paardenserum

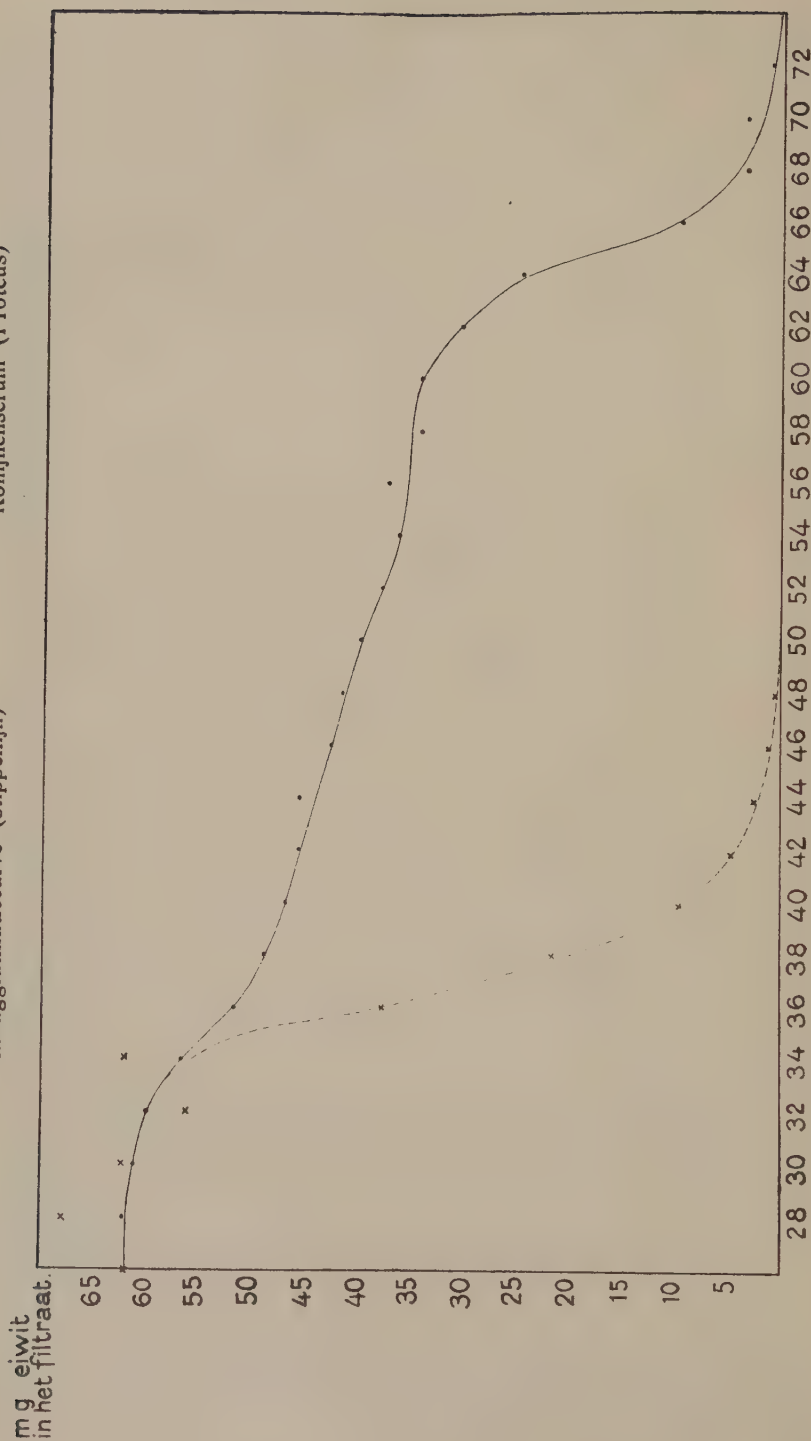
Curve 3

Eiwitcurve
en agglutinatiecure (stippellijn)Konijnenserum (*E. typhi*)

Verzadiging met ammonium sulfaat in %

Curve 4

Eiwitcurve
en agglutinatietcurve (stippellijn)
Konijnenserum (Proteus)

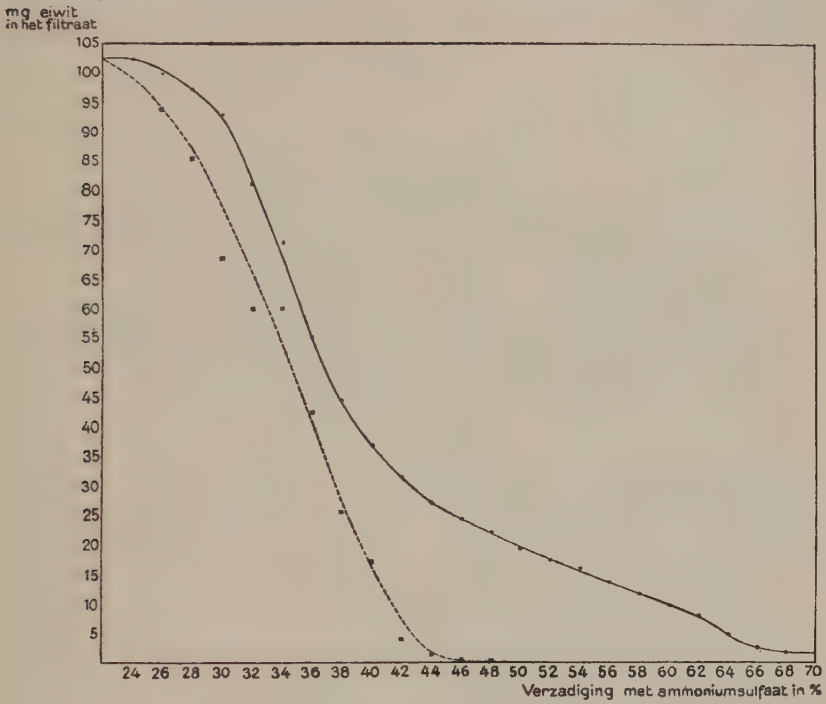


Verzadiging met ammoniumsulfaat in %

Curve 5

Eiwitcurve

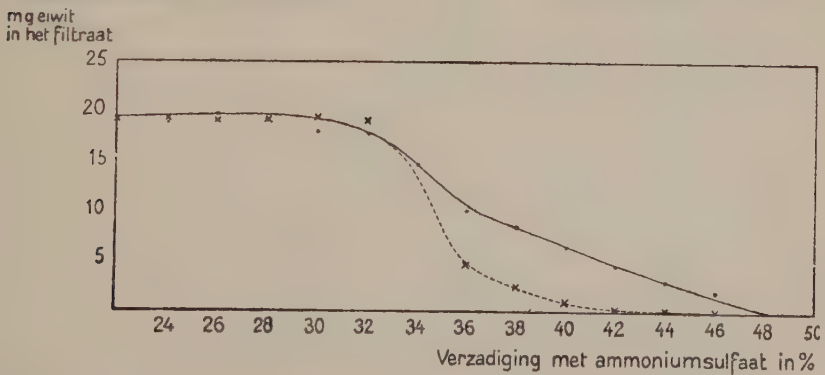
en agglutinatiecure (stippellijn)

Paardenserum (*S. suipestifer*)

Curve 6

Curve „actief eiwit”

en agglutinatiecure (stippellijn)

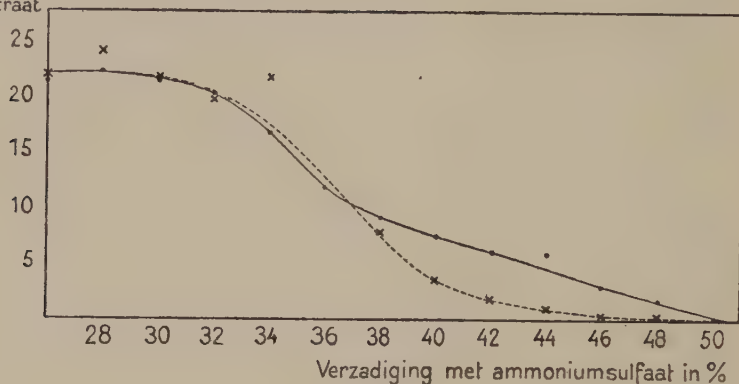
Konijnenserum (*E. typhi*)

Curve 7

Curve „actief eiwit”
en agglutinatiecurve (stippellijn)

Konijnenserum (Proteus)

mg eiwit
in het filtraat

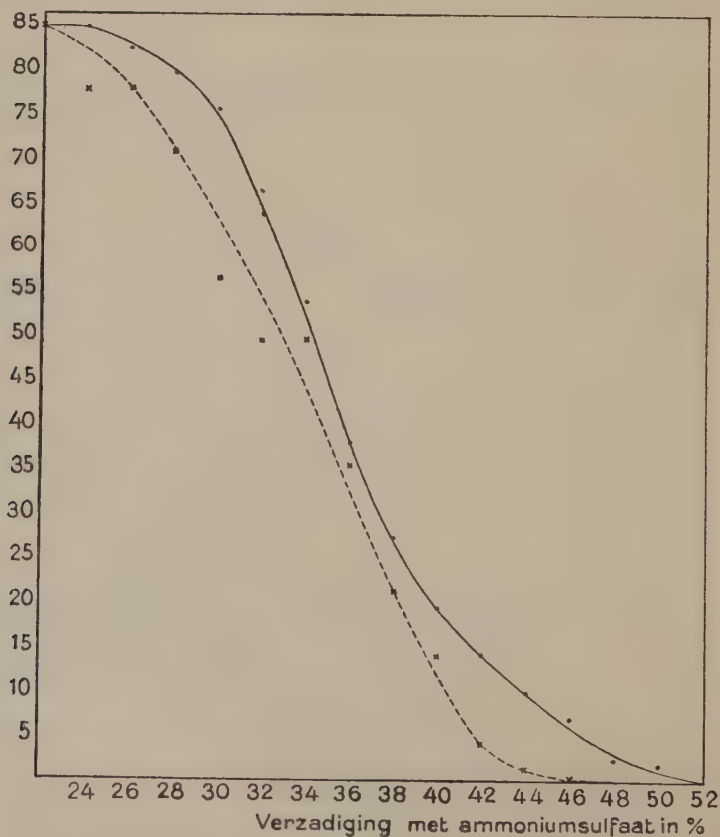


Curve 8

Curve „actief eiwit”
en agglutinatiecurve (stippellijn)

Paardenserum (S. suispestifer)

mg eiwit
in het filtraat



Tabel 1.

AGGLUTINATIE MET GLOBULINEFRACTIES UIT IMMUUN
KONIJNENSERUM (E.typhi).

Ver- dunningen	Na 4 uur				Na 24 uur			
	Verzadiging met ammoniumsulfaat				Verzadiging met ammoniumsulfaat			
	35%	35-40 %	40-45 %	50%	35%	35-40 %	40-45 %	50%
1 : 50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1 : 100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1 : 200	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1 : 400	++±	+++	++±	++±	++±	+++	+++	+++
1 : 800	++	++	±	++	+++	+++	++	+++
1 : 1600	±±	±±	+	±±	++	+++	±±	++
1 : 3200	±±	±±	—?	±±	++	++	±	±±
1 : 4800	+	±±	—	+	±	+	—	±
1 : 6400	+	±	—	±	±	±	—	±
1 : 8000	±	±	—	±	±	±	—	±
1 : 9600	—	—	—	—	±?	±?	—	±?
1 : 11200	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 12800	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabel 2.

AGGLUTINATIE MET GLOBULINEFRACTIES UIT IMMUN
KONIJNENSERUM (Proteus).

Ver- dunningen	Na 4 uur				Na 24 uur			
	Verzadiging met ammoniumsulfaat				Verzadiging met ammoniumsulfaat			
	35%	35-40 %	40-45 %	50%	35%	35-40 %	40-45 %	50%
1 : 100	+++	+++		+++	+++	+++		+++
1 : 200	+++	+++		+++	+++	+++		+++
1 : 400	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1 : 800	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1 : 1600	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1 : 3200	++±	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1 : 6400	++	++±	++±	±	++±	++±	++±	++±
1 : 12800	+	±	±	+	±	±	±	±
1 : 16000	±	+	+	+	+	+	+	+
1 : 19200	±?	±	+	+	±	±	±	+
1 : 22400	±?	±	±	±	±	±	±	+
1 : 25600	—	±	±	±	—	±	±	+
1 : 51200	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabel 3.

AGGLUTINATIE MET GLOBULINEFRACTIES UIT IMMUUN
PAARDENSERUM (S. suipestifer).

Ver- dunningen	Na 4 uur				Na 24 uur			
	Verzadiging met ammoniumsulfaat				Verzadiging met ammoniumsulfaat			
	35%	35-40 %	40-45 %	45-50%	35%	35-40 %	40-45 %	45-50%
1 : 50								
1 : 100	+++	+++			+++	+++		
1 : 200	+++	+++			+++	+++		
1 : 400	+++	+++	+++		+++	+++	+++	
1 : 800	+++	+++	++±		+++	+++	+++	
1 : 1600	++±	++	±±	±±	++	++	++±	+++
1 : 3200	++	±±	±±	±±	++	+	±±	±±
1 : 6400	±±	±±	±±	±±	+	+	+	+
1 : 12800	+	±±	±±	+	±	+	+	±
1 : 16000	—	+	±±	±	±	+	+	±
1 : 19200	—	+	±±	±	±?	+	+	±
1 : 22400	—	+	±±	—	±?	+	+	±
1 : 25600	—	+	+	—	—	+	+	±
1 : 32000	—	±	+	—	—	±	+	±?
1 : 38400	—	—	+	—	—	±	+	—
1 : 44800	—	—	±	—	—	±	±	—
1 : 51200	—	—	—	—	—	±	±	—
1 : 64000	—	—	—	—	—	±?	±	—
1 : 76800	—	—	—	—	—	—	—?	—
1 : 89600	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 102400	—	—	—	—	—	—	—	—

Over de verdeeling der leptospira-stammen in groepen door middel van de agglutinatie-lysis reactie.

Uit het Schüffner laboratorium te Amsterdam

DOOR

B. WALCH-SORGDRAGER en H. BOHLANDER.

Met monovalente konijnen-immunsera zijn in Amsterdam sedert tal van jaren verschillende leptospira-stammen onderzocht. Met het oog op de zonderlinge reacties, die men bij patientensera in het begin der ziekte soms ziet en die verdwijnen, als de titer stijgt, moest de titer van deze immunsera hoog zijn en deze is dan ook bij de te Amsterdam gebruikte meestal 30.000, en zeker niet lager dan 10.000.

Men heeft reeds zeer vroeg groote serologische verschillen waargenomen, b.v. tusschen Indische stammen en de *L. icterohaemorrhagiae*, en de stammen dan ook op grond daarvan in groepen verdeeld. Daarentegen waren de verschillen in reacties van een antiserum met de stammen uit zijn groep over het algemeen niet groot, waarover straks nader. Wij zullen thans nagaan of, nu er zooveel meer stammen bekend worden, er zooveel overgangen bestaan, dat dit onderbrengen in groepen niet meer mogelijk is, en hebben daartoe in een tabel samengebracht alle reacties, in den loop der jaren in het Instituut voor Tropische Hygiëne verricht tot de soortbepaling van de stammen. In tabel I is het aantal en de hoogte dier reacties weergegeven. Het betreft ruim 300 stammen met 1400 reacties, waardoor ze in 11 groepen konden worden verdeeld ¹⁾.

¹⁾ Er zijn hier juist den laatsten tijd uit Indië nog eenige stammen ontvangen, benevens één uit Australië, die nieuw blijken te zijn en nog niet geheel zijn uitgewerkt, waardoor ze in de tabel niet voorkomen. Ook in Indië zelf heeft men 2 nieuwe stammen gevonden. Inplaats van 11 groepen zijn er dus waarschijnlijk ± 16 tot nu toe afgegrensd.

De 11 groepen zijn de volgende:

L. icterohaemorrhagiae	Over de geheele wereld verspreid, komt voor in menschen, ratten, honden enz.
L. canicola	In verschillende landen van Europa en in San Francisco; in mensch en hond.
Salinem	Indië, mensch en rat.
Rachmat	Indië, in den mensch. Bij deze groep is de Akiyami A ondergebracht, die in Japan in mensch en veldmuis, in de F. M. S. in mensch, rat en hond gevonden is.
Swart van Tienen	Indië, in menschen, ook in ratten en katten.
Pomona	Australië; in den mensch.
Hebdomadis	Japan; mensch en veldmuis, Indië: hond.
H. C.	Indië; hond.
Grippytyphosa	Rusland; (verwekker der modderkoorts). Verleden jaar deze stam ook in Beieren gevonden; tot deze groep behoort serologisch ook de Andamanen B stam.
Ballico	Australië; mensch en rat.
Andamanen A.	Andamanen; bij den mensch.

Het aantal stammen in elke groep is zeer verschillend; soms is er maar 1, en kan men niet eens van een groep spreken. De *L. icterohaemorrhagiae* groep bevat de meeste, n.l. 231.

Om de reacties in de tabel samen te voegen, kon geen gebruik worden gemaakt van de hoogte der reactie, uitgedrukt in de serumverduunning, daar dan telkens de titergrens van het antiserum ook zou moeten worden aangegeven, en deze zijn in den loop der jaren vele geweest. Een reactie van 10.000 kan immers (al naarmate de hoogte van het antiserum), de betekenis hebben van een reactie tot de titerhoogte, of tot $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{10}$ of zelfs $\frac{1}{30}$ van de titerhoogte. De hoogte der reacties is daarom berekend in deelen van die toterhoogte en aangegeven als: reacties tot de titerhoogte, tot $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{10}$ enz. (Andrewes). Dit is graphisch weergegeven in tabel I (zie legenda).

Wat bindt nu volgens de agglutinatie-lysis-reacties de leden van één groep zóó samen, dat ze zich onderscheiden van alle andere? Dat is de seroreactie, die met minstens 1 antiserum uit die groep tot de titergrens gaat. Uit de tabel blijkt, dat inderdaad deze hoogte de eenige is, die een verschil uitmaakt tusschen reacties binnen een groep en daarbuiten, omdat zelfs reacties van $\frac{1}{3}$ en $\frac{1}{10}$ der titerhoogte, die in een groep ook wel eens voorkomen, zich daarbuiten even goed vertoonen.

Om welke redenen men aanneemt, dat zulke reacties in het eene geval hoofd-, in het andere mede-reacties zijn, zal straks worden behandeld bij de bespreking der aspecifieke reacties. Specifiek worden genoemd de reacties van stammen met antisera uit de-

zelfde groep, aspecifiek die met antisera uit andere groepen.

Dat de specifieke reacties van $\frac{1}{3}$ en $\frac{1}{10}$ nooit alleen stonden, maar steeds voorkwamen gecombineerd met andere reacties van denzelfden stam met een ander antiserum tot den titer, is in de tabel aangegeven, door deze reacties van $\frac{1}{3}$ en $\frac{1}{10}$ te verbinden aan die, welke tot de titergrens gingen.

Bij sommige groepen is de afscheiding van andere buitengewoon duidelijk, waar nl. alle medereacties zeer laag of 0 zijn (Andamanen A, Ballico enz.), bij enkele moet men zeer nauwkeurig afgrenzen om ze van elkaar te onderscheiden, zooals bij *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *hebdomadis* b.v.

Specifieke reacties.

Bij sommige groepen (waar weinig reacties zijn verricht). en ook wel bij de *canicola*, gaan de reacties bijna alle tot de titergrens, bij de andere, b.v. *L. icterohaemorrhagiae*, gaven de 231 stammen 305 reacties tot de titergrens, bovendien 72 reacties tot $\frac{1}{3}$ en 4 tot $\frac{1}{10}$ van de titerhoogte. Ook andere (*hebdomadis* b.v.) vertoonen eenige reacties die tot $\frac{1}{3}$ gaan; de groep, waar de meeste lage reacties (tot $\frac{1}{10}$) voorkomen, is de Rachmat-Akiyami groep, die daarom afzonderlijk wordt besproken. Hier blijken van de 38 reacties 28 tot den titer te gaan, 7 tot $\frac{1}{3}$ en 4 tot $\frac{1}{10}$. Vooral dit laatste is bij andere niet gezien (bij de *icterohaemorrhagiae* waren er zoo b.v. 4 op de 382 reacties en deze reacties waren alle van zeer ouden datum, zoodat ze niet meer te herhalen zijn.) In tabel II, die deze reacties weergeeft is te zien, dat het anti-Akiyami serum speciaal echter wel het minst tot den titer wordt beïnvloed. Is dit nu een reden om den Akiyami stam afzonderlijk te houden? Als men zich aan een verdeling door de agglutinatie-lysis wil houden, strikt genomen niet, want

1. de stam ging herhaaldelijk met verscheidene Rachmat antisera vlot tot den titer. Onder de stammen, die sprekend op Rachmat lijken, en uit dezelfde streek als Rachmat komen, b.v. E 700, bereiken er ook eenige met Akiyami A antiserum de bovenste grens. Er is dus b.v. geen constant verschil in dit opzicht tusschen de stammen uit Japan en Indië.
2. De medereacties zijn hetzelfde.
De Rachmat geeft steeds een aspecifieke reactie met Pomona, Akiyami A ook.

De Rachmat geeft steeds een aspecifieke reactie met Moscou, Akiyami A ook enz.

Maar ook klinisch en epidemiologisch is er geen steun voor verdeeling.

De Akiyami A, of ook als de verwekker van Hasami koorts *L. autumnalis* geheeten, veroorzaakt endemieën, waarbij de helft der patienten min of meer icterus heeft, waarbij ook haemorrhagiën voorkomen en die dus wel wat op Weil lijken, maar waarbij het sterftecijfer veel lager is, nl. 1.9%. Zoover wij kunnen nagaan, vertoont hij hierin met den Rachmat stam geen principieele verschillen.

Dit neemt niet weg, dat de groep Rachmat, (als al deze reacties ook met nieuwe antisera constant zijn, wat volstrekt niet behoeft te zijn, zie Bangkinang met Jaw Jit antiserum), den indruk maakt van serologisch licht verschillende stammen te bevatten. Rachmat zelf geeft een antiserum, dat het gemakkelijkst andere stammen agglutineert, Akiyami A doet het moeilijker en Jaw Jit houdt het midden. Het zal dus beter zijn, door meer reacties met nog meer antisera uit die groep te onderzoeken, of hun verschillen constant zijn. En zeer zeker zal het noodig zijn, met de Akiyami A een Castellani te verrichten om te trachten, beter inzicht te krijgen in de antigene structuur van deze stammen.

Aspecifieke reacties.

Wij zagen reeds dat de stammen uit een groep met antisera uit een andere, over het algemeen laag, of ten minste zooveel lager dan met hun eigen antiserum reageeren, dat de meeste geen moeilijkheden bij de soortbepaling veroorzaken. Bij uitzondering konden deze reacties evenwel zeer hoog gaan, zóó hoog, dat ze in een enkel geval ook $\frac{1}{3}$ van de titerhoogte bereikten.

1. Dit had plaats bij 5 stammen van *L. icterohaemorrhagiae*, die met een canicola antiserum tot $\frac{1}{3}$ van de titerhoogte gingen,
2. bij eenige *L. icterohaemorrhagiae* stammen, die met het Zanoni antiserum tot $\frac{1}{3}$ gingen,
3. bij 1 stam uit de Salinem groep, die met een antiserum uit de klassieke groep tot $\frac{1}{3}$ ging en
4. bij 1 stam uit de groep hebdomadis (Hd_{10}), die met een antiserum uit de H.C. groep hoog reageerde.

Over het Zanoni antiserum, dat nog niet op de tabel voorkomt,

daar de stam nog niet volkomen is uitgewerkt, zal straks iets worden medegedeeld.

Als voorbeeld geven wij de reacties van de eerste 5, in tabel III. Dat deze stammen toch tot de groep *L. icterohaemorrhagiae* gerekend worden, is om de volgende redenen:

- a. Zij gingen alle met één of meer antisera van *icterohaemorrhagiae* tot de titergrens.
- b. Geen enkele ging er met een *canicola* antiserum tot de titergrens.
- c. Waar de reactie werd herhaald met hetzelfde *canicola* antiserum (219 en City D), ging zij lager, dus tot $1/10$ van de titerhoogte.
- d. Ook waar de reactie met een ander *canicola* antiserum werd gedaan, ging ze lager, b.v. M.- en H.Zweden.
- e. In één der gevallen (Ar) had men te doen met een stam, die de *caviae* na 9 à 10 dagen doodde met icterus. Hij kwam uit een klassiek geval met icterus bij den mensch, dat letaal eindigde. Het eerste (virulentie voor de *cavia*), komt bij *canicola* zelden voor, het laatste hebben wij tot nu toe nooit bij menschenlijke *canicola* infecties gezien. Ook reageerde serum-patient iets hooger met den klassieken stam.
- f. De verzadigingsproef van Castellani wees in één geval uit, dat wij met den klassieken en niet met den *canicola* stam te maken hadden.

Dergelijke argumenten gelden ook voor de overige hooge medereacties.

Moet men nu op grond van deze hooge medereacties gaan onderverdeelen, of van overgangen spreken? Dit komt ons niet alleen ongewenscht, zelfs onjuist voor, omdat deze medereacties vaak zoo inconstant zijn.

De stam J. J. .D. gaf b.v. in Australië een duidelijke aspecifieke reactie met antisera, daar gemaakt met de Andamanen stammen, zoodat de Australische schrijvers hem slechts met eenige restrictie tot de klassieke groep rekenen. In Amsterdam reageerde deze stam met de hier gemaakte Andamanen antisera in het geheel niet.

De stam Resoort, aan wiens antiserum wij eenige hooge medereacties verschuldigd zijn, heeft bij een volgend konijn een antiserum geleverd, dat niet zoo hoog meer meegaat, terwijl een andere stam, H. Utrecht IV, bij het eerste konijn een antiserum verwekte met weinig medereacties met andere stammen, bij het volgende

konijn een met hogere medereacties. De stam Moscou V gaf in Amsterdam in 1935 met een Rachmat antiserum (titer $1/30.000$) een negatieve reactie, in 1937 met een ander Rachmat antiserum (titer $1/30.000$) een aspecifieke reactie van 300, dus tot $1/100$ van den titer. Snijders maakte dan ook de opmerking, dat dit hem deed denken aan de „specific” en „non-specific phase” der H. reacties van de Salmonella groep. De agglutinatie-lysis reactie gaf dus ook wel eenig inzicht in de antigene structuur.

Ofschoon er zonder twijfel wel eenige regelmaat te bespeuren valt wat medereageeren betreft (zooals wij dadelijk zullen zien), lijken toch de hoogten der aspecifieke reacties zoo weinig constant dat men, zoolang men uitsluitend de agglutinatie-lysis reactie met de antisera, op de gewone wijze gemaakt, toepast, er niet genoeg houvast aan heeft, om ze ter onderscheiding der stammen te gebruiken.

Toch valt er wel degelijk eenige regelmaat op te merken in het tot stand komen van aspecifieke reacties; dit blijkt uit de volgende voorbeelden:

1. *L. icterohaemorrhagiae* gaf altijd aspecifieke reacties met canicola en Salinem, en omgekeerd, ten minste met de tot nu toe gebruikte antisera ¹⁾.
2. H. C. gaf altijd aspecifieke reacties met hebdomadis en omgekeerd.
3. Pomona gaf altijd aspecifieke reacties met Rachmat en omgekeerd (aantal reacties echter gering).

Andere groepen daarentegen verschilden, behalve door de specifieke, ook nog door de aspecifieke reacties van elkaar. *L. icterohaemorrhagiae* en *L. canicola* b.v., die toch veel met elkaar gemeen hebben, gedroegen zich t. o. v. van Rachmat antiserum verschillend.

L. icterohaemorrhagiae gaf bij 75 reacties 18 maal een negatieven uitslag met Rachmat antiserum, dus in $1/4$ der gevallen, terwijl *L. canicola* in 20 reacties steeds een negatieven uitslag gaf. Hier

¹⁾ Juist dezer dagen zagen wij voor het eerst 2 nieuwe stammen uit de Salinem groep met een klassiek antiserum geen reactie geven. Dit is een aansporing deze stammen verder te onderzoeken met antiserum van gekookt antigeen, met Castellani enz.

kwam dus door de aspecifieke reacties een verschil tusschen beide groepen voor den dag. Zoo maakt het den indruk, of het al of niet voorkomen van deze medereacties soms op overeenkomst, soms op verschillen tusschen de groepen wijst.

Gaat nu het bepalen van een stam gemakkelijk met de agglutinatie-lysis-reactie, of komen er heel wat reacties aan te pas, voor een stam op zijn plaats gebracht is? Dat hangt er voornamelijk van af, vanwaar een stam afkomstig is. Stammen uit het buitenland en en vooral uit de tropen eischen reacties met antisera uit alle groepen, dus minstens 11 reacties, en als er b.v. hoge medereacties zijn, nog meer. De stammen uit Nederland zijn meestal zelfs met 2, soms met 3 reacties bepaald. Tot nu toe werd hier nl. alleen *L. icterohaemorrhagiae* en *L. canicola* gevonden en meestal gaat de eene reactie dan duidelijk hooger dan de andere. Met het oog op de hoge medereactie, ook van Zanoni antiserum b.v. en misschien van onbekende stammen is het echter noodig, dat één der beide reacties tot de titergrens gaat en is dit niet met het eerst gebruikte antiserum het geval, dan neemt men een tweede antiserum van de groep, waarmee de stam tot $\frac{1}{3}$ titer ging. Dan is men er practisch altijd. Men kan natuurlijk (en dat is, als men geen met gekookt antigeen bereid antiserum heeft, zelfs aan te bevelen), ook een Zanoni antiserum bij de proef betrekken.

Nu is echter de boven gegeven verdeling, gebaseerd op de reactie tot de titergrens, in zooverre onbevredigend, dat zij betrekkelijk willekeurig is, en slechts met één serologische eigenschap rekening houdt, al bleek het, dat men er mee werken kan. Er liggen echter geen cultureele eigenschappen aan ten grondslag, noch is er iets bekend over de chemische samenstelling der antigenen ¹⁾.

Door de agglutinatie-lysis reactie alleen, en dan met antisera met levend antigeen gemaakt, blijft bovendien het inzicht in de antigene structuur beperkt.

De vraag rijst b.v.: Welke antigenen zijn er in het spel bij een reactie tot de titergrens? Uitsluitend groeps antigenen of individuele van iederen stam? Of beide? Als twee stammen uit verschillende groepen met een antiserum uit een 3de groep een medereactie geven, doen zij dat dan met eenzelfde stukje antigeen apparaat, of

¹⁾ Daarentegen is wel bekend, dat verschillende dezer groepen zich onderscheiden in epidemiologische en ziektmakende eigenschappen en verder in drager.

ieder met een ander? Soms geeft de agglutinatie-lysis reactie een antwoord op dergelijke vragen, soms niet.¹⁾

Om het inzicht in de antigene structuur te verruimen, zijn er nog andere hulpmiddelen, en wel:

- a. de toepassing van antisera, gemaakt met gekookt antigeen,
- b. de verzadigingsproef van Castellani.

ad a. Reacties met „0” antisera (gekookt antigeen).

Deze antisera werden gemaakt om te zien, of het zoo gelukken zou, van de hoge medereacties af te komen. De weinige reacties, tot nu toe met dergelijke antisera verricht, gaven de volgende resultaten:

1. De (specifieke) reacties van stammen der canicola groep gingen ook alle tot de titerhoogte met het canicola „0” antiserum.

2. Vier reacties, waarvan de specifiteit twijfelachtig was (Salinem stammen met Zanoni antiserum), waren thans iets lager. De betekenis hiervan kan pas duidelijk worden, als er veel meer reacties van allerlei aard met de „0” antisera verricht zijn.

3. Aspecifieke reacties. Met een „0” antiserum van Alarik (canicola) zagen wij eenige malen geen medereactie van een klas-sieken stam (iets, wat bij de gewone antisera nog nooit door ons werd waargenomen). 2 antisera van H. Utrecht IV, één met gekookt, één met ongekookt antiserum gemaakt, konden vergeleken worden.

De aspecifieke reactie met Wijnberg, die reeds laag was ($1/100$ van de titerhoogte) zakte niet verder, een paar van $1/3$ met M. Zweden en H. Zweden zakte wel, en 1 van $1/100$ (Herk), bereikte ook hier het nulpunt. Ook de stam Salinem, die met H. Utrecht IV zooals gewoonlijk een medereactie gaf, reageerde niet met het „0” antiserum der canicola. Zoo verminderden de aspecifieke reacties van Zanoni antiserum met L. icterohaemorrhagiae van 10.000 tot 30 (van $1/3$ tot $1/30$ van de titerhoogte).

Hoewel hieruit nog niet veel conclusies zijn te trekken (behalve dan dat men zoo inderdaad van hoge medereacties schijnt af te komen, terwijl eenige specifieke reacties tot de titerhoogte bleven

¹⁾ b.v.: een canicola stam reageert steeds met icterohaemorrhagiae antiserum; een Rachmat stam reageert meestal met icterohaemorrhagiae antiserum. Toch geeft de canicola stam geen reactie met Rachmat. Het is dus mogelijk dat de medereactie met icterohaemorrhagiae antiserum van ieder der beide stammen met een ander antigeen tot stand komt.

gaan), zijn de resultaten aanmoedigend genoeg om met gekookt Antigeen door te gaan.

b. De verzadigingsproef van Castellani.

Ook deze werd nog niet vaak toegepast en de techniek zal waarschijnlijk nog wel verbeterd kunnen worden. Toch wees de Castellani reeds op een verschil tusschen klassieke en canicola stammen, tusschen den stam Jaw Jit (Rachmat groep) en Moscou V, tusschen den stam Zanonì en Salinem, die toch zeer hoge reacties met elkanders antiserum gaven. Zoo zal de Castellani kunnen antwoorden op de vraag, hoever de differentiatie van de stammen van de Rachmat-Akiyami groep berust op een verschil in groeps antigeen of in individueele antigenen enz.

Wij meenen dus, dat het terwille van betere kennis der antigene structuur wenschelijk is, zich niet uitsluitend aan de agglutinatielysis reactie met de antisera, door levende cultures gemaakt, te houden, maar hieraan te verbinden de reactie met „0” antisera en de verzadigingsproef van Castellani.

Tabel 11.

SPECIFIEKE REACTIES VAN STAMMEN DER RACHMAT GROEP.

Stammen:	Antisera						
	Rachmat 10.000 25.000 30.000	Baermann 25.000	Jaw Jit 300.000 100.000 30.000	Bangkinang 30.000 50.000	E 700 30.000	Akiyami A 100.000 W.D.A. 50.000	
Rachmat	1) 30.000 <i>t</i>		300.000 <i>t</i>	10.000 <i>t/s</i>	10.000 <i>t/s</i>	30.000 <i>t/s</i> 10.000 <i>t/10</i> 10.000 <i>t/10</i>	50.000 <i>t</i>
Baermann	30.000 <i>t</i>	25.000 <i>t</i>			10.000 <i>t/s</i>		
Jaw Jit	10.000 <i>t</i>		300.000 <i>t</i>		30.000 <i>t</i>	30.000 <i>t/s</i>	
Bangkinang	30.000 <i>t</i> + 10.000 <i>t</i>		300.000 <i>t</i> + 100.000 <i>t/s</i>	50.000 <i>t</i>		30.000 <i>t/s</i>	
E 700	30.000 <i>t</i>		300.000 <i>t</i>		30.000 <i>t</i>	100.000 <i>t</i>	
Kartomonawie 3701	30.000 <i>t</i> +		30.000 <i>t</i>		30.000 <i>t</i>	100.000 <i>t</i>	
L. 700	30.000 <i>t</i>		30.000 <i>t/10</i>				
W. D. A.	50.000 <i>t</i>	25.000 <i>t</i>			30.000 <i>t</i>		50.000 <i>t</i>
Akiyami A	30.000 <i>t</i>		30.000 <i>t</i>		30.000 <i>t</i>	100.000 <i>t</i>	

1) Hoogte der reactie, uitgedrukt in de reciproke waarde der serumverduining.

2) Dezelfde reactie, uitgedrukt in deelen van de titerhoogte.

 t = reactie tot de titerhoogte.
 t/s = " " $1/s$
 $t/_{10}$ = " " $1/_{10}$

Tabel III.

HOOGHE MEDEREACTIES VAN CANICOLA ANTISERUM MET EENIGE KLASSIEKE STAMMEN.

Antisera

Stammen:	Icterohaemorrhagiae					Canicola		
	Wijnberg 10.000 30.000	Verdun 100.000	Lisboa 10.000	Wismar 10.000 30.000	Hickey 10.000	H. Utr. IV 30.000	Resoort 30.000	Alarik 10.000
Ar.	¹⁾ 30.000	²⁾ <i>t</i>					10.000 <i>t</i> / ₃	100 <i>t</i> / ₁₀₀
M. Zweden ...	10.000 <i>t</i> / ₃	30.000 <i>t</i> / ₃	10.000 <i>t</i>	30.000 <i>t</i>	10.000 <i>t</i>	10.000 <i>t</i> / ₃	1.000 <i>t</i> / ₃₀	30 <i>t</i> / ₃₀₀
H. Zweden ...	3.000 <i>t</i> / ₃	30.000 <i>t</i> / ₃	10.000 <i>t</i>	30.000 <i>t</i>	10.000 <i>t</i>	10.000 <i>t</i> / ₃	1.000 <i>t</i> / ₃₀	
Rat 219	30.000 <i>t</i>						10.000 <i>t</i> / ₃	
Rat City D...	30.000 <i>t</i>						3.000 <i>t</i> / ₁₀	

¹⁾ Hoogte der reactie, uitgedrukt in de reciproke waarde der serumverduining.

²⁾ Hoogte der reactie, uitgedrukt in deelen van de titerhoogte.

t = reactie tot de titerhoogte.

t/₃ = " " ¹/₃ "

t/₁₀ = " " ¹/₁₀ " enz.

Tabel IV.

ANTISERA, GEMAAKT MET GEKOOKT EN ONGEKOOKT ANTIGEEN.

Stammen:	Alarik (can.) gekookt 10.000		Hond Utrecht IV (can.) ongekookt 30.000 gekookt 3.000				Zanoni ongekookt 30.000 gekookt 3.000			
	1)	2)								
<i>Canicola</i>										
Alarik	10.000	<i>t</i>	30.000	<i>t</i>	3.000	<i>t</i>				
H. Utr. IV ...			30.000	<i>t</i>	3.000	<i>t</i>				
Siry			30.000	<i>t</i>	3.000	<i>t</i>				
Resoort			30.000	<i>t</i>	3.000	<i>t</i>				
H. Antwerpen .			30.000	<i>t</i>	3.000	<i>t</i>				
<i>L. icteroh.</i>										
Wijnberg	30	$t/_{300}$	300	$t/_{100}$	30	$t/_{100}$	3.000	$t/_{10}$	30	$t/_{100}$
M. Zweden	100	$t/_{100}$	10.000	$t/_{3}$	100	$t/_{30}$				
H. Zweden	30	$t/_{300}$	10.000	$t/_{3}$	300	$t/_{10}$				
Oosterp. 432 ...	100	$t/_{100}$								
Sumatra IV ...	300	$t/_{30}$								
Herk	0	0	300	$t/_{100}$	0	0				
Coenr. 431	0	0								
Chopra	0	0								
Kantorowicz ...							10.000	$t/_{3}$	30	$t/_{100}$
J. J. D.							10.000	$t/_{3}$	30	$t/_{100}$
<i>Salinem.</i>										
Salinem			1.000	$1/_{30}$	0	0	10.000	$t/_{3}$	300	$t/_{10}$
Imoen							10.000	$t/_{3}$	300	$t/_{10}$
Rat 148							10.000	$t/_{3}$	300	$t/_{10}$
Polhaupessy ...							10.000	$t/_{2}$	300	$t/_{10}$

1) Hoogte der reactie, uitgedrukt in de reciproke waarde der serumverduunning.

2) Hoogte der reactie, uitgedrukt in deelen van de titerhoogte.

t = reactie tot de titerhoogte.

$t/_{3}$ = " " $1/_{3}$

$t/_{10}$ = " " $1/_{10}$ " enz.

Saltaties bij Schimmels

DOOR

H. A. DIDDENS ¹⁾

Het verschijnsel „saltaties” bij schimmels ²⁾ behoort thuis binnen het ruime en algemeene gebied der variabiliteit, zoodat het niet anders kan dan dat ook hier deze saltaties gezien worden in het licht van het wijdere gebied der gevariëerdheid.

De term „saltatie”, die Stevens waarschijnlijk het eerst gebruikte, geeft het verschijnsel weer van plotseling optreden van een nieuwen stam in een culture, die men rein pleegt te noemen, dus hetzij 1-spore-cultures, hetzij cultures, die na uitzaaiing geruimen tijd constant bleken te zijn (hoewel er ook saltatieonderzoekers zijn, die zelfs deze eischen aan reinheid niet stellen). De term „saltatie” is een neutrale term, die dus alleen wil aangeven, dat de verandering tot iets nieuws plotseling optrad en niet de pretentie heeft ook het „waarom” te willen uitdrukken; dat hierbinnen cytoplasmatische- en chromosomen-veranderingen vallen, zal hieronder nader blijken.

Doordat tallooze plotselinge veranderingen in schimmelcultures door vele onderzoekers *mutaties* genoemd worden, zonder dat deze eenig onderzoek naar den aard der verandering hebben ingesteld, komt het, dat voor vele mycologen de term saltatie synonym is met mutatie. In Amerika bijv. wordt vrij algemeen elke saltatie met den naam mutatie aangeduid. Dit en het in ander opzicht achteloos gebruiken van den term saltatie doet in de literatuur verwarrend aan.

¹⁾ Gaarne maak ik van deze gelegenheid gebruik om Professor Dr. J. A. Honing hier mijn groote erkentelijkheid te betuigen voor de moeite, die hij zich heeft gegeven het manuscript kritisch te willen doorzien.

²⁾ Bij de bespreking van saltaties bij schimmels is slechts een greep gedaan uit het vrijwel oneindige literatuurgebied en daarbij werd alleen dat naar voren gehaald, wat het belangrijkste leek om deze groep saltaties als een geheel te kunnen overzien; verder zijn, ook juist vanwege de uitgebreidheid van het onderwerp, de saltaties bij bacteriën buiten beschouwing moeten blijven.

Toch komt in het algemeen de opvatting van saltatie, in den zin van plotseling optredende nieuwe varianten bij schimmelcultures, het sterkst naar voren. In dezen zin is ook het onderstaand overzicht gedacht (cf. ook p. 130).

Het verschijnsel van salteeren is zeer algemeen bij schimmels; hoewel de eene meer saltanten oplevert dan de andere soort, ontkomt men eigenlijk niet aan den indruk, dat elke schimmel in bepaalden graad salteerneigingen bezit. Zoo verkreeg S t a k m a n binnen het jaar van één stam van *Ustilago zae* (Beckm.) Unger 220 saltanten, waarvan 162 verschillend waren en C h r i s t e n s e n en G r a h a m zagen bij 1200 1- spore- cultures van *Helminthosporium gramineum* Rabenh. 125 verschillende culture-types.

De klassieke vorm, waarin saltanten optreden, is die van den sector; dit zijn dus wigvormige of waaivormige sectoren, die al of niet van het centrum van de culture uitgaan en in verschillende eigenschappen van de stamculture afwijken. De aldus gevormde saltatie wordt, als men tenminste met petriscalen werkt, niet gemakkelijk over het hoofd gezien; iets anders is dit met saltaties, die pleksgewijze in een kolonie optreden of zelfs als „ondergroei” in een kolonie, zoodat overentingen uit een dergelijke culture vreemde verrassingen kunnen bezorgen. Zulke z.g. gemaskeerde saltaties treden vaak in het oudste mycelium op en komen zoodoende pas tot uiting in nieuwe overenten. Ook kunnen saltanten verborgen blijven, zooals nog nader zal worden besproken, doordat ze morphologisch identiek zijn met de stamculture, maar daarvan alleen verschillen in physiologisch of pathogeen opzicht.

Bij het voortkweeken van saltaties blijkt het dikwijls, dat het mycelium van den betreffenden sector een mengsel was van dat van de stamculture en de saltant; het is in zoo'n geval vaak moeilijk de saltant rein te krijgen; heeft men echter de saltant in reinculture, dan blijkt deze vaak later weer de stamculture terug te produceeren, al of niet in sectorvorm; dit zijn de z.g. *cyclische saltaties*, die d a s G u p t a bijv. bij stammen van *Diaporthe perniciosa* (Ell. et Ev.) March. kreeg, waarbij een der saltanten steeds op een bepaalden leeftijd de stamculture terugleverde. Hiertegenover staan de *orthogenetische saltaties*, waarbij een bepaalde culture steeds een nieuwen stam geeft, die echter constant blijft en niet weer de stamculture produceert. Voor de volledigheid voeg ik hieraan toe het geval van *saltatie* tot *complementaire* stammen, waarbij twee stam-

men van fungi imperfecti, die afzonderlijk steriel zijn, tezamen behoorlijk fructificeeren. Als voorbeeld hiervan noemt d a s G u p t a twee steriele stammen van *Cytosporina ludibunda* Sacc., die in combinatie een goede ontwikkeling van pycniden te zien geven.

Het minst belangrijk en dubieus lijken wel de *reverteerende saltaties* s.s., die gedurende het tijdsverloop van één culture, reeds weer de eigenschappen van de stamculture gaan vertoonen.

Wat de verschillen tusschen stamculture en saltant betreft: deze kunnen aan één of meer kenmerken te onderscheiden zijn; bovendien kunnen de verschillen van *morphologischen* of *physiologischen* aard zijn en het kan *virulentieverschillen* betreffen.

De *morphologische* verschillen betreffen in de eerste plaats — wat macroscopische kenmerken aangaat — de kleur, de ontwikkeling en type van het mycelium en de sporenvorming. De sterkste ontwikkeling ligt dan eens aan de zijde van de saltant, dan weer is de stamculture intensiever gekleurd, produceert meer sporen of overvloediger mycelium. Het uiterlijk der cultures — bijv. ondergedoken mycelium t.o. luchtmycelium met daarbij totaal andere kleuren of een rijke sporenontwikkeling naast een nagenoeg steriele culture — kan zóó totaal uiteenlopend zijn, dat men reeds aan de hand hiervan besluiten zou met minstens twee verschillende species te doen te hebben.

Ook in microscopische kenmerken komen deze verschillen sterk tot hun recht, voornamelijk wat den aard van vertakking van de hyphen betreft en het sporentype (grootte, vorm, kleur, septering, enz.). Deze eigenschappen zijn nu in de systematiek meestal de grondslagen, waarop de scheiding in soorten, ja soms in geslachten berust.

Dickson verkreeg door behandeling met X-stralen bij verschillende *Chaetomium*-soorten saltanten met zeer afwijkend behaarde peritheciën. Als men bedenkt, dat de systematiek der *Chaetomium*-soorten in hoofdzaak gebaseerd is op den vorm en de structuur van deze haren, dan lijkt het, bij het bezien van de afbeeldingen, die Dickson geeft, niet onwaarschijnlijk, dat iemand, bij onbevooroordeelde determinatie van vele saltanten tot heel andere soorten zou komen dan de soort, waartoe de stamculture behoort. Vele saltanten van Christensen van *Helminthosporium sativum* P. K. et B. verschilden meer van deze soort dan bijv. *H. teres* Sacc. en *H. gramineum* Rabenh. daarvan verschillen.

Blochwitz verkreeg van een *Aspergillus*-soort een saltant

met vertakte conidiëndragers, die volgens systematische begrippen dus bij het geslacht *Penicillium* zou moeten hooren.

Bij het doorlezen van de literatuur van saltaties bij schimmels blijkt wel duidelijk, dat in vele gevallen van determinatie van saltanten, deze — wanneer men niets van de herkomst zou weten — als nieuwe soorten beschouwd zouden worden.

De *physiologische* verschillen zijn meestal bepaald aan groei-proeven op voedingsbodems, die verschillen in samenstelling en pH. Uit den aard der zaak kunnen, zooals reeds gezegd werd, dergelijke saltanten, indien ze zich morphologisch niet onderscheiden, onopgemerkt blijven.

Wat de *parasitaire* eigenschappen van saltanten vergeleken met die van de stamculture betreft: ook hierin treft men sterk uiteen-loopende verschillen in dien zin, dat de saltant zoowel virulenter als minder virulent kan zijn dan de oorspronkelijke culture. Minder virulente saltanten verkreeg T u bij *Fusarium culmorum* (W. Sm.) Sacc. en U l l s t r u p bij *Gibberella Saubinetii* (Mont.) Sacc., waarbij de laatste tevens het merkwaardige feit constateerde, dat met sterke mycelium-ontwikkeling een groote pathogeniteit gepaard ging.

Saltanten met versterkte virulentie werden in de „school van S t a k m a n” herhaaldelijk aangetoond bij *Ustilago zae* (Beckm.) Unger en *Helminthosporium sativum* P. K. et B. (C h r i s t e n s e n). Voor den phytopatholoog zijn deze verschillen natuurlijk van het allergrootste belang bij het zoeken naar resistente waardplanten.

Als men nu aan de vele gevallen van onopgemerkte saltaties denkt, die stellig bij de normale kweekwijze van schimmels in buisjes nog veel minder gauw (dan bij cultures in petrischalen) in het oog zullen loopen, dan lijkt het niet uitgesloten, dat vaak een geval van avirulent- worden in culture verklaard kan worden door het optreden van een niet-virulente saltant; deze kan een groot deel of het grootste deel van de culture ingenomen hebben en bij de verschillende overenting en meer of minder gauw den moederstam verdrongen hebben. „In een dergelijk geval heeft de schimmel niet haar virulentie verloren, doch men heeft de schimmel verloren.”

Gaat men na, onder welke omstandigheden saltaties tot stand komen, dan valt het op, dat er een groote groep is, die „zoo maar” ontstaan, d. w. z. die ontstaan tengevolge van omstandigheden, die men niet kent. Er zijn onderzoekers, zooals C h a u d h u r i, die het extreme standpunt verdedigen, dat er onder de saltaties nage-

noeg geen werkelijk constante zijn, en dat ze alle het gevolg zijn van ongunstige voedingsvoorwaarden, z.g. „nutritive saltations”. De consequentie van dit standpunt zou kunnen zijn, dat alle saltaties modificaties zijn, die weer, zoodra men de gunstige voedingsvoorwaarden herstelt, de eigenschappen van den moederstam krijgen. Welke echter de ongunstige factoren zijn, is helaas bijna altijd onbekend in dergelijke gevallen. En ook juist om deze reden kan het vaak niet uitkomen, dat de aard van de saltatie een (Dauer)-modificatie is.

Men is geneigd in het licht van deze beschouwingen over ongunstige voedingsvoorwaarden de vele gevallen van raadselachtige *pleomorphie* (in den zin van steriel- en onkarakteristiek worden) bij dermatophyten te bezien en de helaas talrijke voorbeelden, die ieder, die geregeld met schimmelcultures te doen heeft, een doorn in het oog zijn, van cultures, die hun sporevormend vermogen bij lang voortkweken verliezen of waarbij bepaalde physiologische eigenschappen verdwenen lijken. Nog altijd zijn er onderzoekers, die dan graag hun stokpaardje van „aanpassing” willen berijden. Toch zal niemand, die een monographie over het genus „krokodil” wil schrijven, zich er toe beperken deze studie in „Artis” te volbrengen. Maar hoe het zij, het lijkt toch beter voorloopig als werkhypothese vast te houden aan de opvatting, dat al deze veranderingen het gevolg zijn van een ongeschikt voedingsmilieu, waarvan de ongunstige factor of factoren ons helaas meestal nog onbekend zijn.

Een voorbeeld van een schimmelgeslacht, waarin geregeld veel saltaties optreden, is *Fusarium*. Volgens B r o w n neemt het aantal saltaties bij dit geslacht sterk toe, indien men bijv. werkt met een vrij geconcentreerden voedingsbodem (hij zelf gebruikte modificaties van de bekende „Richard's agar”). B r o w n ' s conclusie is „that the tendency of the *Fusarium* strain to saltate is a function of the cultural medium”. Als gevolg van deze opvatting raadt hij dan deze bodems voor *Fusaria* sterk af en adviseert ze op verdunde bodems aan te houden, bijv. op aardappel-agar, indien men een constante culture wenscht te houden.

Een tweede voorbeeld van „zoo maar salteeren” is het optreden van „rough”- en „smooth”-vormen bij *Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal., beter bekend onder den onjuisten naam *Monilia albicans*, een gistachtig pathogeen organisme; dit bekende verschijnsel in S en R duidt de resp. gladde en ruwe kolonies aan, die o.a. ver-

schillen in de mate van ontwikkeling van het pseudo-mycelium; verder is S in het algemeen de pathogene vorm, terwijl R geen parasitaire eigenschappen bezit. S en R kunnen in elkaar overgaan (wederkeerige reversies) en ook intermediaire vormen SR treden op. Negróni maakte uitvoerige studies over deze reversies en onlangs publiceerde Cavallero hierover een belangrijke bijdrage, waarin hij aantoonde, dat hij via factoren van het voedingsmilieu deze reversies beïnvloeden kan. Terecht wijst hij er verder op, dat de verschillen tusschen S en R binnen de grenzen van de soort vallen en dat men bij de systematiek terdege rekening heeft te houden met de variabiliteit van dit organisme. Het spreekt vanzelf, dat men aan het verschijnsel van S en R., dat ook bij andere *Mycotoruloïdeae* voorkomt, volle aandacht moet besteden, indien men deze organismen isoleert en bestudeert.

Geheel toevallig lijkt ook het ontstaan in een culture van Brierley van *Botrytis cinerea* Pers. van een geheel kleurloos sclerotium, dat bij voortkweeken cultures gaf, die ook alleen in dit kenmerk van den oorspronkelijken stam afweken.

Dit zijn slechts enkele voorbeelden uit de talrijke der literatuur, waarbij dus saltanten optreden in cultures, zonder dat er — volgens ons weten — sprake was van bepaalde, veranderde en wellicht ongunstige factoren.

Dat voedingsfactoren een belangrijke rol kunnen spelen, werd reeds vermeld. Sommige auteurs zijn van meening, dat ook uitdroging een aanleiding kan zijn voor het ontstaan van saltanten; zoo meent Blochwitz bij *Aspergillus glaucus* Link verliesmutaties verkregen te hebben door uit te gaan van heel oude, dus ingedroogde, sporen. De kleur van een *Aspergillus* hangt af van twee kleurstoffen: in wand en in celinhoud. De verhouding van deze beide kleurstoffen is afhankelijk van physiologische factoren, ouderdom en stam. In Blochwitz' geval van overenting uit een 9 jaar oude culture, was de wandkleurstof verdwenen. Deze eigenschap, zegt Blochwitz, gaat verloren bij oud, ingedroogd materiaal, vóór de sporen hun kiemkracht verliezen. Zijn werk lijkt echter niet zeer overtuigend, in de eerste plaats, daar dergelijke oude cultures een wel wat dubieus uitgangspunt zijn. Daar hij bovendien met niet zeer betrouwbaar materiaal (in genetischen zin) werkte, lijkt zijn betiteling van de optredende saltant met den term mutatie toch wel eenigszins voorbarig.

Een feit, dat verder vrij algemeen naar voren komt in de litera-

tuur over saltaties, is het verschijnsel, dat saltaties vaker voorkomen in oud dan in jong mycelium. Dit trof *Brown* ook in zijn onderzoek met *Fusarium* en daarom ried hij behalve een verdund milieu tevens aan steeds van de uiterste peripherie van een kolonie (dus van de allerjongste hyphen) over te enten, teneinde saltaties te vermijden. *Horne* en *das Gupta* hebben met het oog op dit probleem proeven met *Diaporthe pernicios*a (Ell. et Ev.) March. gedaan om aan te toonen, dat stam DH_C op zekeren leeftijd salteert tot stam DH_F . Dit deden ze door van een kolonie van DH_C iederen dag kleine stukjes over te enten, die elk op een vasten afstand van het centrum van de kolonie verwijderd waren. Zoo konden ze zien, dat DH_C op een leeftijd van een bepaald aantal dagen overging tot DH_F .

Tegenover de groote categorie der hierboven genoemde saltaties, de z.g. „natuurlijke saltaties”, staan diegene, welke men door het toepassen van bepaalde kunstgrepen tracht te verkrijgen; dit zijn de *geïnduceerde saltaties*. Naast schimmels, waarbij salteeren een zeer algemeen voorkomend verschijnsel is, komen tallooze voor, waarbij nooit of zelden saltaties zijn waargenomen. Om bij de laatste toch saltaties te willen zien optreden, moet kunstmatig ingegrepen worden:

1. Bepaalde *chemicaliën* worden aan den voedingsbodem van de betreffende culture toegevoegd (giften, narcotica, antiseptica).

Verschillende onderzoekers probeerden al of niet met succes Zn -zouten ($ZnSO_4$ of $Zn(NO_3)_2$). Essentieel hierbij blijkt, dat men, om een positief resultaat te bereiken, een bijna-lethale concentratie van het Zn -zout moet nemen. *Dimock* verkreeg bijv. op deze wijze talrijke sectoren in een 1-spore-culture van *Fusarium oxysporum* Schl. var. *gladioli* Massey, die na tallooze uitzaaireksen den indruk gaven constant te zijn. Erg belangrijk was het, dat hij bovendien door Zn -toevoeging een variant verkreeg in één van de geslachtsstammen van *Hypomyces ipomoeae* (Halst.) Wr. Bij dit genetisch zuivere materiaal (cultures uit 1 hapl. spore) kon hij door kruisingsproeven den aard van deze variatie nagaan, waarop hier niet nader wordt ingegaan. Merkwaardigheidshalve zij er hier nog op gewezen, dat *Dimock* bij zijn verschillende onderzoekingen over deze saltaties ook de kansen in den strijd om het bestaan van de nieuwe varianten tegenover den moederstam naging; de eersten kwamen er doorgaans slecht af, daar ze o.a. langzamer groeiden,

minder conidiën vormden en bij kruising met een saltant van verschillend geslacht geen peritheciën ontwikkelden.

Zeer bekend is ook het onderzoek van Schiemann, die $K_2Cr_2O_7$ gebruikte bij *Aspergillus niger* v. Tieghem; naast modificaties traden constantblijvende varianten op, die ze mutaties noemde. Deze waren bruinig van kleur, wat de naam der nieuwe soorten, die ze er van maakte, *A. cinnamomeus* en *A. fuscus* al aangeeft. Dat dit werkelijk blijvende veranderingen zijn, is vrij zeker; in het „Centraalbureau voor Schimmelcultures” is *A. fuscus* sedert 1912 onveranderd aanwezig; *A. cinnamomeus* vormt sedert eenigen tijd slechts mycelium, zoodat hier niets met zekerheid over gezegd kan worden.

De mutaties van Dimock en Schiemann worden door deze auteurs niet beschouwd als een specifiek effect van Zn of Cr_2O_7 , maar als het effect van gestoorde metabolische processen tengevolge van één of meer factoren. Voor deze opvatting pleit ook het feit, dat Schiemann volkomen identieke mutanten kreeg door te werken met hoge temperaturen; ook andere storende invloeden als Zn-zouten (Archichowsky), narcotica (Waterman), radium-emanities (Kresling en Stern) leverden bij andere auteurs bruine mutanten bij *Aspergillus niger* v. Tieghem.

2. Zooals hier reeds ter sprake kwam, kunnen *hooge temperaturen* ook saltaties induceeren. Bekend op dit gebied is het onderzoek van Barnes, die werkte met verschillende schimmels als *Thamnidium elegans* Link, *Botrytis cinerea* Pers., *Eurotium herbariorum* Link. De meeste varianten verkreeg hij bij temperaturen, die net niet hoog genoeg waren om de sporen te doden.

3. Een derde belangrijke methode om saltaties te induceeren is *bestraling* met X-stralen of ultraviolet licht. Dickson paste dit bij vele verschillende fungi toe. Typisch was, dat hij bij een *Fusarium*, die normaliter sterk salteert, bij bestraling niets bereikte. Vele saltanten in sectorvorm verkreeg hij bij soorten van het geslacht *Chaetomium*. Oude deelen der cultures leverden bij bestraling meer saltanten op dan jonge deelen, vermoedelijk, omdat de jongste deelen van een culture vrijwel uitsluitend uit mycelium bestaan en het gebleken was, dat mycelium-alleen geen saltanten produceerde. Van belang is verder, dat X-stralen en ultraviolette bestraling dezelfde types van saltanten geven. Ook dit wijst weer op de niet-specifieke werking der bestraling. Werden de saltanten naderhand weer bestraald, dan salteerden deze verder; vele van deze nieuwe

sectoren waren identiek met de oorspronkelijke culture (reverteerden dus naar het oorspronkelijke type).

De invloed van radium-emanaties op cultures van *Aspergillus niger* v. Tieghem bespreken Kresling en Stern. Ze verkregen op deze wijze nieuwe rassen; bij de sterkste doses ontstonden cultures, die geheel steriel waren en daardoor wit van kleur; iets minder sterke doses gaven bruinachtige rassen met wat minder sterk gedegenereerde conidiëndragers en sporen. Dat dergelijke experimenten ook van practisch belang kunnen zijn, bijv. voor de industrie, toont het feit, dat één van de nieuwe rassen een aanmerkelijk grootere opbrengst aan citroenzuur gaf. Volledigheidshalve voeg ik hier nog aan toe, dat deze auteurs onder den invloed van bestraling met radium en ultraviolet licht dezelfde types van saltanten (of nieuwe rassen) kregen.

Al weet men van den aard van de verandering nog niets, toch duiden de verschillende proeven over geïnduceerde saltaties er op, dat al die identieke veranderingen via een storing in het fysiologisch evenwicht in de cel optreden.

Terwijl in het voorafgaande in het kort een overzicht werd gegeven, welke soorten van saltaties onderscheiden worden en welke omstandigheden blijkbaar voor het ontstaan ervan gunstig zijn, zal thans getracht worden op het wezen der saltaties in te gaan om daarbij uit te maken, hoe deze in genetischen zin op te vatten zijn.

Allereerst zal dan iets gezegd moeten worden over variabiliteit bij schimmels in het algemeen, een verschijnsel, dat oogenschijnlijk misschien niets te maken heeft met saltaties, maar, zooals blijken zal, daarmee toch vaak nauw verbonden is.

Ieder, die wel eens schimmels determineert, of geïdentificeerde cultures controleert, merkt, dat in wel 90% der gevallen de schimmel niet heelemaal met de beschrijving klopt. Vooral vroegere auteurs hebben weinig of niet rekening gehouden met de groote variabiliteit der schimmels. Als we determineeren, hebben we steeds te doen met gemiddelden, die we graag generaliseeren voor systematische doeleinden; dit kan ook het gevaar zijn, als ik het zoo uitdrukken mag, van herbarium-materiaal en van stammen van een collectie schimmelcultures, daar deze alle slechts één phenotype representeren van de soort. Dit gevaar verdwijnt echter, indien men maar doordrongen is van het feit, dat elke soort een populatie is van weinig tot zeer vele stammen.

Verschillende saltatie-onderzoekers leggen hier sterk den nadruk op, bijv. Brierley en Leonian; een uiting van den laatsten bijv. is, dat men bij een gezonde taxonomie geen „last” meer zou hebben van dissocianten; verder komen dergelijke onderzoekers vaak met beslist afschuw op tegen mycologen, die zulk een ruime opvatting missen en elke kleine afwijking als een gretige aanleiding benutten om een n. sp. te beschrijven.

Enkele voorbeelden van vele stammen binnen één soort worden hier gegeven: Herbst, Rudloff en Schmidt isoleerden stammen van verschillende *Venturia*-soorten van verschillende vruchtboomen; daarbij vonden zij, dat niet alleen één enkele appelboom vele stammen van *V. inaequalis* (Cke.) Aderh. herbergde, maar dat zelfs op één enkel blad een populatie van verschillende stammen aanwezig is. Hansen kon bij 300 isolaties van *Botrytis cinerea* Pers. van verschillende planten en uit verschillende streken 123 types onderscheiden. Ieder, die wel eens met cultures van *Cerastostomella ulmi* Buisman werkte, weet, hoe totaal verschillend diverse stammen er uit kunnen zien, hoe groot de gevarieerdheid bij deze soort is. Walter wijdt hier een speciale publicatie aan.

Ziet men nu bovendien in de cultures van verschillende stammen van een bepaalde soort a. h. w. voor zijn oogen nieuwe stammen (saltanten) zich afscheiden van den oorspronkelijken stam, dan is het duidelijk, dat men nog beter een soort beschouwt als een populatie van veranderende samenstelling.

Voor het bestudeeren van het wezen der saltaties is het noodig met zuiver materiaal te werken. Afgezien van het groote aantal onderzoekingen op dit gebied, waarbij aan de voorwaarde van 1-celcultures niet eens is voldaan, werken de meesten met isolaties van één conidie of één hyphe-top. Dergelijke cultures — dus ongeslachtelijke voortplantingen van één enkel individu — zijn eigenlijk „Klonen” en bij ontbreken van een perfect stadium bij de betreffende schimmel is dit de hoogste graad van zuiverheid, die men bereiken kan.

Dat zulk een culture echter heelemaal geen waarborg van zuiverheid in genetischen zin geeft, wil ik met enkele voorbeelden illustreeren.

Shands en Dickson isoleerden bij hun onderzoek naar de variabiliteit van *Helminthosporium gramineum* Rabenh. kiembuizen van conidiën. Daar de verschillende cellen van deze conidiën vaak elk een kiembuis ontwikkelen, isoleerden zij ook van één enkele

conidie een aantal kiembuizen, waarbij bleek, dat deze dikwijls verschillende cultures opleverden. D a s G u p t a isoleerde zijtakjes van één enkele hyphe of twee aaneengrenzende hyphecellen en verkreeg op deze wijze twee duidelijk verschillende types van cultures. De oorzaak van dit verschijnsel kan in de veelkernigheid liggen; in zeer vele gevallen bevatten de hyphecellen en conidiën der fungi imperfecti bijv. vele kernen en in bijna al deze gevallen is de ontstaanswijze van deze kernen onbekend. Dit is een groote leemte in kennis, daar niet één cel, maar één kern een zuivere eenheid in de genetica is. Ook H a n s e n wijst hierop in zijn jongste werk over het „dual phenomenon” (cf. p. 127).

De meeste genetici zouden geen genoegen nemen met dergelijk materiaal, waarmee veel schimmelonderzoek op dit gebied is gedaan. Om immers het wezen van een verandering in een organisme na te gaan, is het noodig kruisingsproeven met haploïde stammen uit te voeren, waarbij een analyse der F_2 generatie uitsluitsel kan geven.

In dit opzicht nu — het veelal ontbreken van een geslachtelijk stadium en de onbekendheid met de cytologie — zijn de schimmels een ongeschikt studieobject.

Ook één ascospore garandeert nog geen haploïde culture: men denke slechts aan de aanwezigheid van twee kernen in de normale ascosporen van *Neurospora tetrasperma* Shear et Dodge. Dat alleen cultures, uitgaande van één haploïde cel bij Ascomyceten zuiver onderzoekingsmateriaal leveren, wordt met klem naar voren gebracht in het belangrijke genetische onderzoek van *Saccharomyces ellipsoideus* Hansen door W i n g e en L a u s t s e n. Deze wijzen er terecht op, dat door vele microbiologen, die met Saccharomyceten werken, vaak over het hoofd is gezien, dat niet een „één-cel-culture” de kleinste biologische eenheid vertegenwoordigt, maar dat bij deze diploïde organismen een „één-(asco)spore-culture” pas een „zuivere lijn” waarborgt. Uitgaande bij een willekeurigen stam van een *Saccharomyces* — die dus diploïed is — van één vegetatieve cel, houdt men, afgezien van eventueel optredende saltaties, een constante culture, zoolang de celvermeerdering vegetatief blijft („Klon”); zoodra echter asci en ascosporen gevormd worden, zullen bij de kieming van de laatsten tengevolge van splitsing bij de reductiedeeling, nieuwe types optreden, tenzij de oorspronkelijke vegetatieve cel een homozygoot was, wat bij een willekeurigen *Saccharomyces*-stam uiterst zeldzaam zal zijn. Voor de volledigheid zij

er nog op gewezen, dat ascosporen-vorming dikwijls geheel onopgemerkt kan blijven in cultures, daar deze plaats kan vinden tegen den glaswand boven den voedingsbodem.

Ook bij andere diploïde organismen, waar zelfbevruchting mogelijk is, heeft men met de hier genoemde splitsingsmogelijkheden rekening te houden.

Het werk van W i n g e en L a u s t s e n, die nauwkeurig de haplo- en diplophase, de schijnbaar parthenogenetische ascus-vorming en erfelijke splitsingsverschijnselen bij *Saccharomyces ellipsoideus* Hansen onderzochten, werd hier genoemd, omdat daarin zoo duidelijk naar voren komt, dat de zuiverheid van een „één-cel-culture” betrekkelijk zijn kan.

Ontwikkelt een schimmel geen perfect stadium, dan moet men met gewone „één-cel-cultures” werken, welke door langdurige reeksen van 1-spore-uitzaaiingen op homogeniteit getest worden.

Naast dezen grondeisch voor zuiverheid, blijkt uit veel werk, hoe noodig het is, lang te observeeren, vóór men een nieuwe variant constant mag noemen. Er zijn onderzoekers, die dit na drie culturengeneraties al durven beweren, terwijl bijv. Brierley na 127 overentingen van een stam van *Botrytis cinerea* Pers. moest constateeren, dat een vermeende mutatie langzamerhand weer de eigenschappen van de oorspronkelijke culture begon aan te nemen, dus meer als „Dauermodificatie” of vast geïnduceerde modificatie op te vatten was.

Naar den aard van opgetreden saltaties (variatiën) kunnen verschillende terminologieën gevolgd worden, bijv. de gebruikelijke van de erfelijkheidsleer:

1a. De *modificaties*, dus niet-erfelijke variatiën, ontstaan tengevolge van invloeden van voeding en omgeving; ook deze kunnen in den vorm van sectoren optreden en wel in erg dun gegoten schalen; V a s u d e v a vond dit bij cultures van *Fusarium fructigenum* Fr., waarbij de bochtige vorm der culture op een kolonie met verscheidene sectoren lijkt en noemde dit verschijnsel „valsche sectoren”. Christensen viel dit zelfde verschijnsel op bij zijn onderzoekingen over physiologische specialisatie van *Helminthosporium sativum* P. K. et B. Uit den aard der zaak krijgt men bij overenten op normaal gegoten platen of op normale voedingsbodems weer een culture met de oude eigenschappen. Toch kan het ook gebeuren, dat men, onkundig van een ongunstigen factor — en hoe gemakkelijk kan één van de talloze factoren aan de aandacht ontsnap-

pen! — een modificatie daardoor aanziet voor een constante variatie, bijv. een mutatie.

Om deze reden zijn hier ook de modificaties, hoewel ze eigenlijk op het terrein der saltaties niet thuis hooren, daar ze niets nieuws brengen, even genoemd.

b. Hierbij sluit zich aan de categorie der vast geïnduceerde modificaties („Dauermodificaties”), varianten, die weliswaar plotseling kunnen optreden, doch vroeger of later langzamerhand weer de eigenschappen van de oorspronkelijke culture aannemen; evenmin als rubriek 1a behooren deze varianten dus eigenlijk bij de saltaties thuis, daar echter vermeende saltaties wel eens als „Dauermodificaties” geïnterpreteerd werden, zijn ze hier even besproken.

Vele auteurs bijv. die niet aan den eisch van lang-observeeren voldoen, en bijv. na drie of vier overentingën het reeds wagen van mutaties te spreken (nog afgezien daarvan, dat ook vaak de zuiverheid en betrouwbaarheid van het materiaal alles te wenschen overlaat) kunnen met dergelijke vast geïnduceerde modificaties te doen gehad hebben. Ook de talloze gevallen van saltanten, die na een zeker aantal overentingën een geleidelijke verandering naar de eigenschappen der stamculture vertoonen, wijzen hierop. Of *Caldisen Coons*, die bij verschillende phytopathogene schimmels (*Colletotrichum Lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Bri. et Cav., *Cladosporium fulvum* Cke., *Septoria apii* (Bri. et Cav.) Chester, enz.) witte steriele sectoren kregen, die op den duur, vroeger of later, weer reverteerden naar de eigenschappen van de stamculture, met recht deze interpreteren als „Dauermodificaties”, is de vraag, daar er nooit duidelijk een langzame verandering der saltanten beschreven wordt, maar wel vermeld wordt, dat deze vroeg of laat plotseling kunnen reverteeren tot den ouderstam; deze reversies blijven echter tot gelijkheid van kleur beperkt, daar het sporenvormend vermogen niet weer terugkeert. Een meer plausible verklaring van deze opgetreden saltanten geeft *Hansen* (cf. p. 127) in zijn recente publicatie in verband met de heterocaryose theorie.

De geïnduceerde saltaties, die, zooals reeds besproken werd, *Schiesmann* bij *Aspergillus niger* v. Tieghem door inwerking van chemicaliën of hooge temperaturen kreeg en welke ze zelf mutaties noemde, worden door verschillende onderzoekers voor „Dauermodificaties” gehouden. Vooral *Brierley* uit zich sceptisch, waarbij hij den nadruk legt op de constantheid van deze schimmel, waarmee door talloze biologen e.a. onder de extreemste

omstandigheden is gewerkt, zonder dat de schimmel veranderde.

Wel is het waar, dat enkele van Schieman's variaties niet plotseling optraden — en om deze reden eigenlijk niet met den term saltatie betiteld mogen worden —, maar pas na 11 generaties, d. w. z., dat de optredende verandering niet plotseling was, doch geleidelijk en pas na 11 culture-generaties constant.

Ook Blochwitz kreeg bij *Aspergillus flavus* Link na 15 generaties bij bepaalde vochtigheid een nieuwen stam, die, indien deze een tijd constant is gebleven, wat de publicatie niet vermeldt, bij deze categorie zou kunnen passen.

Op deze cytoplasmatische varianten volgen de meer belangrijke (echte) saltanten, waarbij de veranderingen berusten op een erfelijke verandering van de kern of op de verandering in de samenstelling der verschillende kernen binnen de cel, tengevolge van scheiding of bijeenkomen van deze.

2. Bij beschouwing van deze groep van variaties in het algemeen, noem ik in de eerste a) plaats het optreden van nieuwe stammen in cultures als gevolg van *bastaardeering*. Bij de brandzwammen worden hiervan talrijke voorbeelden gegeven (Christensen en Holton), waarop hier niet nader wordt ingegaan.

b) Hierbij aan sluiten zich de gevallen van *splitsing* van bastaarden en heterozygoten. Zooals vanzelf spreekt, is deze verklaring bij het optreden van een nieuwen stam in een culture alleen gerechtvaardigd na een zuiver analytisch onderzoek; bij fungi imperfecti waarbij de perfecte vorm nooit gevonden, maar alleen vermoed wordt, kan deze slechts een hypothese zijn.

Abnormaliteiten in kerndeelingen blijken ook een rijk terrein voor speculaties te zijn, daar deze eigenlijk nooit te bewijzen zijn. Dat deze zeer waarschijnlijk voorkomen, toont op dit gebied een geval van Holton aan, die werkte met *Ustilago avenae* (Pers.) Jensen en *Ustilago levis* (K. et Sw.) Magn. en bastaarden van deze. Na afsnoering van de eerste vier sporidiën aan de vier cellen van het promycelium worden bij deze brandzwammen hieraan successievelijk meer series sporidiën ontwikkeld. Bij vergelijking van cultures van successievelijke sporidiën van één enkel segment van het promycelium, bleken deze, hoewel van het zelfde geslacht, alle verschillend te zijn (een uitkomst, die zeker niet verwacht werd).

3. Een groot aantal saltaties wordt gerangschikt bij de *mixochimaeren*, waarbij de erfelijke verschillen het gevolg zijn van een

scheiding of combinatie van kernen van verschillend type. Deze treden dus op bij veelkernige schimmels. Het klassieke voorbeeld van een kunstmatige synthese van twee stammen is dat van Burgeff, die ook den naam „mixochimaere” hiervoor aannam. Hij mengde n.l. den celinhoud van twee stammen, een + en een — stam van *Phycomyces nitens* (Kunze) v. Tieghem et le Monnier¹⁾. Daarbij ging hij als volgt te werk: hij sneed de top van een hyphe van een + stam af en een dergelijk stuk bij een — stam; daarop stak hij het dunne topgedeelte van de — hyphe in het breedere onderste gedeelte van de + hyphe. Door voorzichtig met een naald op de — hyphe te drukken, barstte deze, waarbij zich de celinhoud vermengde met dien van de + hyphe. Op deze wijze verkreeg Burgeff een mechanische vermenging van een + en een — stam; de culture, die hiervan het resultaat was, bleek een neutralen stam van *Phycomyces nitens* op te leveren. In dit geval kan men het ontstaan van dezen heterocaryotischen stam (een stam met verschillende soorten kernen) a.h.w. voor zijn oogen zien geschieden. Minder duidelijk is dit bij Hansen en Smith, die bij vermenging van twee constante stammen (M(ycelial) en C(onidial)) van *Botrytis cinera* Pers. naast deze twee stammen een derde type kregen, dat bij verdere analyse steeds weer splitste in de twee constante homotypes (M en C) en het niet-stabiele type ($X = MC$) zelf. Zij gingen bij deze proef uit van conidiën en mycelium van beide stammen, die in warme agar intens geschud en gemengd werden (z.g. „co-cultures”); wanneer de agar hard geworden was, werden hiervan kleine stukjes overgeënt. Hoewel zij op deze wijze dus in dit geval niets nieuws verkrijgen, wijzen zij — ter verklaring — met recht op het zeer algemeen voorkomend verschijnsel van anastomose en fusie tusschen hyphen en kiembuizen; dit verschijnsel is volgens hen en anderen de basis der heterocaryose in de natuur en levert mixochimaeren. Zij leggen er in hun betoog den nadruk op, dat de kern de basis van het organisme is en niet de cel, zoodat een veelkernige conidie (de meeste conidiën zijn veelkernig) eigenlijk geen individu, maar een groep van individuen is; slechts, indien al deze kernen gelijk zijn, krijgt men, van één enkele conidie uitgaande, een genetisch zuivere culture.

Van bijzonder belang lijkt het voortgezette onderzoek van Hansen, dat perspectieven kan openen om in de toekomst vele

¹⁾ Volgens een latere publicatie van Burgeff (1925, Flora, N. F., Bd. 18/19, p. 40) behoort deze *Phycomyces Blakesleeanus* Burgeff te heeten.

saltaties of z.g. mutaties bij fungi imperfecti te verklaren. Hij onderzocht 916 isolaties van 30 verschillende genera en vindt bij meer dan 50% het voorkomen van twee constante, verschillende culture-types; dit verschijnsel noemt hij het „dual phenomenon”. Bij analyse met 1-spore-cultures blijken dergelijke „dual fungi”, zooals boven voor *Botrytis cinerea* Pers. beschreven werd, drie types van cultures op te leveren, n.l. twee constante (M en C) en één of meer intermediaire types MC, die niet constant zijn en bij analyse met 1-spore-cultures uiteenvallen in M, C en MC.

Ook „co-cultures” van M en C gaven, evenals bij het vorige onderzoek geschetst werd, het niet-stabiele MC type.

Het blijkbaar algemeene verschijnsel, dat bij fungi imperfecti twee types optreden, — hetwelk bij de onderzochte conidie-isolaties van fungi perfecti niet voorkwam — kan volgens H a n s e n met heterocaryose verklaard worden: in de conidiën van deze schimmels zijn volgens hem twee soorten genetisch verschillende kernen aanwezig, in getale van twee tot meer. Ook schimmels zooals *Verticillium albo-atrum* R. et Berth., die hoofdzakelijk 1-kernige conidiën (enkele meerkernige) hebben, kunnen „dual” zijn. De meeste geïsoleerde imperfecte schimmels zijn in de „MC-toestand”; splitsing tot M en C kan, behalve in het laboratorium, ook in de natuur voorkomen, hoewel het samenkleven van conidiënmassa's en de veelvuldige anastomoses deze homotypes zeldzamer dan MC doen optreden.

H a n s e n, die uit de literatuur talrijke voorbeelden citeert, waarbij het optreden van twee verschillende types (fructificeerend t. o. steriel) met het „dual phenomenon” verklaard zou kunnen worden, wijst op het algemeene van dit verschijnsel, zoodat dit volgens hem zou wijzen op een normalen toestand bij de meeste fungi imperfecti. Het bestaan van verschillende MC types, aange-toond bij dit laatste onderzoek van H a n s e n bij schimmels met veelkernige conidiën (cf. de fraaie photo's van *Botrytis cinerea* Pers.) wijst misschien een weg aan om de talrijke gevallen van geleidelijke veranderingen in cultures te verklaren.

Dat anastomose de basis der variatie is, vinden ook vele andere auteurs, die hun objecten tevens cytologisch bestudeeren. Het is n.l. niet voldoende te constateeren, dat er anastomose is en dat de hyphcellen en conidiën veelkernig zijn, maar het is van essentieel belang het ontstaan van die kernen na te gaan. Zoo bestudeerde G r a h a m *Helminthosporium gramineum* Rabenh., die veel sal-

tanten in sectorvorm oplevert. De meeste cellen bleken na kleuring 4—7 (1—13) kernen te bevatten. Van wezenlijk belang lijkt wel zijn vondst, dat ook heel jonge conidiën al veelkernig waren. Ook Shands en Dickson kwamen met dezelfde schimmel tot hetzelfde resultaat en dezelfde conclusie. Graham beweert zelfs, dat, indien alle kernen identiek waren, wat onwaarschijnlijk is, de verschillen in aantallen kernen in verschillende cellen aansprakelijk kunnen zijn voor verschillende eigenschappen.

Voordat de literatuur besproken wordt van onderzoekers, die zich tegen de theorie der heterocaryose uitspreken, moet nog even gewezen worden op twee andere gevallen. Zooals hierboven vermeld werd, verkregen Hansen en Smith bij vermenging van twee constante stammen van *Botrytis cinerea* Link een derde niet-stabiele stam, hetgeen zij met de heterocaryose-theorie verklaarden. De vermenging van twee verschillende soorten *Botrytis*, n.l. *B. allii* Munn en *B. ricini* Godfrey, die zeer uiteenloopen en lang op constantheid beproefd waren, gaf in 20 1-cel-cultures voor 25% een nieuw type, dat niet intermediair was en constant bleek te zijn; dit type was te beschouwen als een nieuwe soort. In tegenstelling met het eerste geval van deze auteurs ontstond nu dus een nieuw homotype. Reeds, omdat hier niet met zekerheid fusie is waargenomen, komt de verklaring van heterocaryose niet in aanmerking.

Dat fusies misschien ook van practisch belang voor den mycoloog kunnen zijn, geeft het werk van Davidson, Dowding en Buller aan. Deze constateerden, dat bij verschillende huidschimmels fusie bestaat tusschen twee cultures, mits deze tot dezelfde soort behooren. Daar, zooals bekend is, dermatophyten spoedig pleomorph worden en dan alle hetzelfde onkarakteristieke uiterlijk hebben en bovendien dan vaak steriel zijn, zou „fusie” een belangrijk hulpmiddel kunnen blijken te zijn bij het determineeren, door n.l. deze pleomorfe cultures te combineeren met goed gedefinieerde, bekende standaard-cultures.

Het critische werk van Dickinson, die met veelvuldig salteerende *Helminthosporium*- en *Fusarium*-soorten werkte, stelt zich tegenover de heterocaryose-theorie. In de eerste plaats vond hij, dat alle jonge takjes, jonge conidiëndragers en conidiën aanvankelijk 1-kernig zijn (bij *H. pedicellatum* Henry); de talrijke kernen van één cel ontstaan hier uit één enkele kern; de cellen van de onderzochte *Fusarium*-soorten bleken zelfs alle 1-kernig te zijn. In

dergelijke cultures kan fusie natuurlijk niet verantwoordelijk gesteld worden voor het optreden van saltanten, tenzij men de verschillende aantallen (gelijke) kernen aansprakelijk stelt voor de afwijkingen (cf. G r a h a m). Verder wees D i c k i n s o n op het verschijnsel van pseudo-fusie naast echte fusie; daarbij worden de wanden tusschen de aaneengrenzende cellen niet doorbroken, doch hoogstens vormt zich een soort appressorium, terwijl bij echte fusie doorbreking van beide wanden plaats vindt. Vaak heeft men beide verschijnselen niet van elkaar onderscheiden. In tegenstelling met de opvatting van B u l l e r c.s. (cf. de publicatie van D a v i d s o n, enz.) trof hij ook fusie tusschen twee verschillende soorten van een geslacht aan. Teneinde veel fusies in een culture te krijgen, bleek het al voldoende er met een entnaald door heen te strijken; in microcultures verkreeg hij steeds fusie door twee hyphen naast elkaar te leggen, waarop hij de fusie-cellen isoleerde. Hij voerde dit bij vele combinaties uit, maar verkreeg op deze wijze nooit nieuwe vormen, maar steeds de oorspronkelijke stammen of een mengsel van beide. In geval van fusie dient men ook na te gaan, of de protoplasma's met de kernen zich wel grondig vermengen; dit punt is vaak niet bestudeerd; K ö h l e r ging na, dat dit na anastomose bij *Botrytis narcissicola* Klebahn en *Botrytis allii* Munn niet het geval is. Christensen en Davies bestudeerden anastomose bij *Helminthosporium sativum* P. K. et B. en *Helminthosporium tetramera* Mc K. en andere *Helminthosporium*-soorten in mengcultures en komen tot dezelfde conclusies als D i c k i n s o n, wat de cytologie betreft. Wel vonden deze onderzoekers, dat tusschen twee verschillende soorten echte fusie zelden was, maar pseudo-fusie veel voorkwam. Daar heterocaryose in deze gevallen uitgesloten is en het volgens hen niet om cytoplasmatische veranderingen gaat (o.a. daar de versmelting van cytoplasma niets nieuws leverde), rangschikken zij hun saltaties 4) onder de rubriek *mutaties*, waaraan dus een erfelijke verandering van het idioplasma, de chromosomen, ten grondslag ligt. Zooals vanzelf spreekt, blijven dergelijke veronderstellingen volkomen hypothetisch bij deze fungi imperfecti, daar een zorgvuldig genetisch onderzoek — dat dit eventueel alleen zou kunnen bewijzen — hier uitgesloten is. Toch zijn er ook gevallen, die meer zekerheid geven, van mutaties bij schimmels, bijv. de saltanten in de haploïde stammen van *Ustilago zeae* (Beckm.) Unger van Stakman, de Zn-variant van *Hypomyces ipomoeae* (Halst.) Wr., waarover reeds gesproken is, enz. Behalve bij enkele zuiver te

onderzoeken gevallen, wordt meestal tot mutatie besloten, als de andere mogelijkheden niet in aanmerking komen.

Tot dusver zijn de saltaties in het licht van variaties en gevarieerdheid in het algemeen gezien. Het bestaan van vele stammen, rassen binnen één soort (gevarieerdheid) wordt meestal tegenwoordig als een gewoon verschijnsel beschouwd. Treedt echter zoo'n nieuwe variant in den vorm van een sector op, dan lijkt dit velen een mysterie. Dit behoeft echter niets speciaals te zijn: de verandering treedt hier op in één bepaald punt van een centrifugaal voortgroeijende kolonie. En juist om dezen vorm der saltaties worden deze graag parallel beschouwd en vergeleken de bekende *knop-varianties* en *plantenchimaeren* bij de hogere planten.

Deze vergelijking lijkt — althans voor een deel der saltaties — inderdaad gerechtvaardigd; in beide gevallen kan men het nieuwe type vegetatief als een homogeen geheel voortplanten; in beide gevallen treedt het nieuwe type als een sector op; plantenchimaeren kunnen kunstmatig geproduceerd worden door enting, wat zijn parallel vindt in de mixochimaeren van Burgeff en Hansen en Smith. Dat schimmels meer salteeren dan hogere planten, is slechts oogenschijnlijk, daar er meer met schimmels in dit opzicht gewerkt is, vooral vanwege het gemak en de snelheid, waarmee de meeste dezer zich laten kweken.

Overziet men nog even de verschillende interpretaties van het verschijnsel van salteeren, dan lijkt het voorloopig het beste elk geval op zich zelf te beschouwen en bij een poging tot verklaring streng vast te houden aan diverse eischen als zuiverheid en langobserveeren of zonder dat liever van een interpretatie af te zien en een tot niets verbindenden term als saltatie te gebruiken. Deze term, die zich in hoofdzaak dekt (cf. modificaties en „Dauermodificaties”) met den meer algemeenen term variatie in de erfelijkheidsleer, blijkt op het gebied der fungi langzamerhand sterk ingeburgerd te zijn en wint het in het gebruik van den term variatie (variant); een eventuele verwarring met de veelvuldig voorkomende „var.” (varietas) — onderverdeeling der soorten — bij de fungi zou dit laatste misschien eenigszins kunnen verklaren. Zoo lijkt de neutrale term saltatie bij de schimmels voorloopig nog wel op zijn plaats.

Tenslotte zou ik nog iets willen zeggen over het belang van saltaties. In de allereerste plaats voor den *systematicus-mycoloog*.

I. Bij het doorlezen van literatuur over saltaties en variaties ont-

komt men niet geheel aan het deprimeerende gevoel, dat het te wenschen was, dat de heele mycologische systematiek opnieuw begonnen moest worden, zonder dat er rekening te houden was met het oude. Want hoe weinig auteurs — de goede niet te na gesproken — hebben er ook maar eenigszins rekening mee gehouden, dat elke soort een populatie is van rassen, waarvan de samenstelling bovendien verandert. Vele saltatie-onderzoekers hekelen dan ook terecht in vaak bloemrijke taal hun collega's, die om een kleine afwijking zoo graag hun naam achter een nieuwe soort zetten.

Door het dikwijls onopgemerkt blijven van saltaties, worden deze vaak als nieuwe soorten beschreven.

Wiltshire vond in een *Stemphylium*-culture sectoren met *Alternaria*-eigenschappen, die weer reverteerden tot *Stemphylium*. Deze auteur beschouwde *Alternaria* als een stadium in de levensgeschiedenis van *Stemphylium*. Een dergelijke zienswijze doet de gedachte opkomen, dat de systematiek van deze beide genera wel eens herzien mocht worden. Sindsdien heeft Wiltshire zijn werk ook in dezen zin voortgezet. Clyde Christensen, die met 1-spore-cultures van *Pestalotia funerea* Desm. werkte, kreeg vele nieuwe rassen als sectoren in zijn cultures, w.o. een ras met sporen met slechts 1 borstel. Dit roept de vraag op, of de scheiding tusschen *Monochaetia* (een geslacht met conidiën met 1 borstel) en *Pestalotia* (met conidiën met verscheidene borstels) wel gerechtvaardigd is. Ook andere rassen van *Pestalotia funerea* van Christensen toonden zulke afwijkingen in aantal borstels, kleuring der mediane cellen van de conidiën of in maten (alle belangrijke determinatie-kenmerken), dat er niet veel overblijft van de monographie van Guba, welk werk doorgaans geraadpleegd wordt bij het identificeeren van *Pestalotia*-soorten. Das Gupta werkte met een *Cytosporina*, welk geslacht gekarakteriseerd is door pycniden met z.g. „B”-sporen (draadvormige sporen) en verkreeg daarbij saltanten, die naast dit sporentype z.g. „A”-sporen (ovale sporen) hadden. Het genus *Phomopsis* is in het bezit van „A”- en „B”-sporen; zoo gaat men ook hier twifelen aan een juiste geslachtsafgrenzing.

Deze enkele voorbeelden hierboven en het feit, dat naar voren komt uit bijna alle artikelen over saltaties, n.l. dat in het meerendeel der gevallen de saltanten, zonder dat men rekening zou houden met de ontstaanswijze, stellig als nieuwe soorten opgevat zouden worden, manen toch wel bijzonder tot voorzichtigheid en tot het besef,

dat de systematiek, die we hebben, nog veel verbetering behoeft.

II. In de tweede plaats is het verschijnsel van saltaties belangrijk voor den *laboratorium-mycoloog*, die veel met cultures te doen heeft. Het zal hem misschien, vaker dan hem lief is, gebeuren, dat het optreden van saltanten in zijn cultures hem ontgaat, zoodat er op eens een culture is, die het niet meer „doet”. Dit zal misschien ook een prikkel zijn om het wezen van de opgetreden veranderingen nader te onderzoeken.

III. Door de proeven van Kresling en Stern werd gewezen op de mogelijkheid, dat saltaties ook van nut kunnen zijn voor de *industrie*, bijv., indien een nieuwe stam een grootere opbrengst geeft van een bepaald product.

IV. Tenslotte wordt nogmaals gewezen op het groote belang van saltaties voor den *phytopatholoog*, die bijv. bij het zoeken naar resistente rassen bij cultuurplanten met dit feit rekening heeft te houden. Dat Stakman binnen twee jaren bij zijn 200 1-sporidiecultures duizende mutanten zag optreden, waarbij minder- en sterker virulente stammen dan den betreffenden moederstam, zegt reeds genoeg. Vooral ook Stakman wijst daarbij op het gevaar van het onopgemerkt blijven van vele saltanten, zoodat een schijnbaar virulentieverlies in de culture kan optreden.

L I T E R A T U U R:

- Archichovskij, V., Zur Frage über den Einfluss von $ZnSO_4$ auf eine Reihe von Generationen von *Aspergillus niger*. 1908, Centralbl. f. Bakt., u.s.w., Abt. II, Bd. 21.
- Barnes, B., Variation in *Botrytis cinerea* Pers., induced by the action of high temperature. 1930, Ann. of Bot., Vol. 44, N. 176, p. 825.
- , Induced variation. 1936, Trans. Brit. Myc. Soc., Vol. 20, p. 17.
- Blochwitz, A., Eine allgemeine Ursache spontaner Verlustmutationen bei Schimmelpilzen. 1923, Ber. d. Dtsch. Bot. Ges., Bd. 41, p. 205.
- , Entstehung von *Aspergillus*-Varietäten mit verzweigten Conidienträgern. 1925, Ber. d. Dtsch. Bot. Ges., Bd. 43, p. 105.
- Brierley, W. B., On a form of *Botrytis cinerea* with colourless sclerotia. 1920, Philosoph. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B, Vol. 210, p. 83.
- , Variation in fungi and bacteria. 1926, Proc. Intern. Congress Pl. Sc., Vol. 2, p. 1629.
- , Biological races in fungi and their significance in evolution. 1931, Ann. appl. Biol., Vol. 18, p. 420.
- Brown, W., Studies in the genus *Fusarium*. IV. On the occurrence of saltations. 1926, Ann. of Bot., Vol. 40, p. 223.
- Burgeff, H., Ueber Sexualität, Variabilität und Vererbung bei *Phycomyces nitens*. 1913, Ber. d. Dtsch. Bot. Ges., Bd. 30, p. 679.

- Caldis, P. D. and Coons, G. H., Achromatic variations in pathogenic fungi. 1926, Papers of the Michigan Acad. of Sc., Arts and Letters, Vol. 6, p. 189.
- Cavallero, C., Etude expérimentale sur les phénomènes de la variation et de la dissociation de *Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal. 1938, Boll. d. Ser. Ital., Vol. 10, p. 36.
- Chaudhuri, H., Nutritive saltation in fungi. 1931, Journ. Ind. Bot. Soc., Vol. 10.
- Christensen, Cl, Cultural races and the production of variants in *Pestalozzia funerea*. 1932, Bull. of the Torrey Bot. Club, Vol. 59, p. 525.
- Christensen, J. J., Physiologic specialization and mutation in *Helminthosporium sativum*. 1925, Phytopath., Vol. 25, p. 785.
- , The influence of temperature on the frequency of mutation in *Helminthosporium sativum*. 1921, Phytopath., Vol. 19, p. 155.
- and Davies, F. R., Nature of variation in *Helminthosporium sativum*. 1937, Mycologia, Vol. 29, p. 85.
- and Graham, T. W., Physiologic specialization and variation in *Helminthosporium gramineum* Rab. 1934, Techn. Bull. 95, Univ. Minnesota, Agric. Exp. Sta.
- Davidson, A. M., Dowding, E. S. and Buller, A. H. R., Hyphal fusions in dermatophytes. 1932, Canad. Journ. of Res., Vol. 6, p. 1.
- Dickinson, S., The Nature of saltation in *Fusarium* and *Helminthosporium*. 1932, Techn. Bull. 88, Univ. Minnesota, Agric. Exp. Sta.
- Dickson, H., The effect of X-rays, ultraviolet light and heat in producing saltants in *Chaetomium*. 1932, Ann. of Bot., Vol. 46, N. 182, p. 389.
- , Saltation induced by X-rays in seven species of *Chaetomium*. 1933, Ann. of Bot., Vol. 47, N. 188, p. 735.
- Dimock, A. W., Variation in a species of *Fusarium* induced by high concentrations of zinc salts. 1936, Zentralbl. f. Bakt., u.s.w., Abt. II, Bd. 95, p. 341.
- , Observations on sexual relations in *Hypomyces ipomoeae*. 1937, Mycologia, Vol. 29, p. 116.
- , Hybridization studies in a zinc-induced variant of *Hypomyces ipomoeae*. 1937, Mycologia, Vol. 29, p. 273.
- , Hybridization experiments with natural variants of *Hypomyces ipomoeae*. 1937, Bull. of the Torrey Bot. Club, Vol. 64, p. 499.
- Graham, T. W., Physiologic specialization and variation in *Helminthosporium gramineum* Rab. 1935, Phytopath., Vol. 25, p. 284.
- Das Gupta, S. N., Saltation in Fungi. 1936, Lucknow Univ. Studies, N. V, Fac. of Sc.
- Hansen, H. N., The dual phenomenon in imperfect fungi. 1938, Mycologia, Vol. 30, p. 442.
- and Smith, R. E., The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. 1932, Phytopath., Vol. 22, p. 953.
- ———, The origin of new types of imperfect fungi from interspecific co-cultures. 1935, Zentralbl. f. Bakt., u.s.w., Abt. II, Bd. 92, p. 272.

- Herbst, W. Rudloff, C. T. und Schmidt, M., Vergleichend-morphologische Studien an verschiedenen *Venturia*-arten. 1937, Gartenbauwiss., Bd. 11, p. 183.
- Holton, S., Studies in the genetics and cytology of *Ustilago avenae* and *Ustilago levis*. 1932, Techn. Bull. 87, Univ. Minnesota, Agric. Exp. Sta.
- Köhler, E., Zur Kenntnis der vegetativen Anastomosen der Pilze. II. 1930, *Planta*, Vol. 10, p. 495.
- Kresling, E. und Stern, E., Ueber die Wirkung von Radium- und ultravioletten Strahlen auf die Entwicklung, die biochemischen Eigenschaften und die Rassenbildung des *Aspergillus niger*. 1936, Zentralbl. f. Bakt., u.s.w., Abt. II, Bd. 95, p. 327.
- Negroni, P., Variación hacia el tipo R de *Mycotorula albicans*. 1935, Rev. d. 1. Soc. Arg. d. Biol. y d. su filial 1. Soc. d. Biol. d. Rosario, Vol. 11, p. 449.
- , Ensayos para obtener la reversión de la forma R a la S de *Mycotorula albicans*. 1936, Rev. del Instituto Bact., Vol. 7, p. 393.
- Schiemann, E., Mutation bei *Aspergillus niger* v. Tieghem. 1912, Zeitschr. f. indukt. Abst. u. Vererb. lehre, Bd. 8.
- Shands, H. L. and Dickson, J. G., Variation in hyphal top cultures from conidia of *Helminthosporium gramineum*. 1934, *Phytopath.*, Vol. 24, p. 559.
- Stakman, E. C., Christensen, J. J., Eide, C. J. and Peterson, B., Mutation and hybridization in *Ustilago zeae*. 1929, Techn. Bull. 65, Univ. Minnesota, Agric. Exp. Sta.
- Stevens, F. L., The *Helminthosporium* foot rot of wheat, with observations on the morphology of *Helminthosporium* and on the occurrence of salutation in the genus. 1922, Bull. of the Ill. State Nat. Hist. Survey, Vol. 14, p. 77.
- Tu, Ch., Physiologic specialization in *Fusarium* spp. causing head blight of small grains. 1930, Techn. Bull. 74, Univ. Minnesota, Agric. Exp. Sta.
- Ullstrup, A. J., Studies on the variability of pathogenicity and cultural characters of *Gibberella Saubinetii*. 1935, Journ. Agric. Res., Vol. 51, p. 145.
- Vasudeva, R. N. S., On the occurrence of „false sectors” in cultures of *Fusarium fructigenum* Fr. 1930, Trans. Brit. Myc. Soc., Vol. 15, p. 96.
- Walter, J. M., Variation in mass isolates and monoconidium progenies of *Ceratostomella ulmi*. 1937, Journ. Agric. Res., Vol. 54, p. 509.
- Waterman, H. J., Mutation bei *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger*. 1913, Zeitschr. f. Gärungsphysiol, p. 1.
- Wiltshire, S. P., A reversible Stemphylium- *Alternaria* saltation. 1932, Ann. of Bot., Vol. 46, p. 343.
- Winge O. and Laustsen, O., On two types of spore germination and on genetic segregations in *Saccharomyces*, demonstrated through single-spore cultures. 1937, Compts. rend. Lab. Carlsberg, Sér. physiol., Vol. 22, p. 99.

Een eenvoudige methode tot het zuurstof-vrij maken van het plaatoppervlak voor het kweken van Anaerobionten

De „Ring” methode

DOOR

JONKVROUWE M. VAN RIEMSDIJK

Het kweken van den Anaerobiont op het plaat-*oppervlak* stelt aan de techniek de zwaarste eischen.

Waar in vloeibare- of hooge vaste voedingsbodems, het zuurstofmijdende micro-organisme kan „wegkruipen” en zich daar kan nestelen waar de O_2 -spanning van dien aard is, dat groei en verdere ontwikkeling ongeschaad kunnen plaats vinden, daar biedt het plaat-*oppervlak* geen van deze voordeelen, en blijft het organisme ten volle bloot staan aan de giftige inwerking van den zuurstof; eisch is dus hier, dat deze zoo spoedig mogelijk wordt geëlimineerd. Weliswaar zal de *sporen-dragende* anaerobiont deze schade iets beter kunnen verdragen, voor den „niet” sporenvormer zijn de verhoudingen op zijn zwaarst.

Voor het bewerken van een groot aantal Petri-schalen tegelijk zijn de grootere klok-apparaten in gebruik (Botkin, Novy, Maaszen, Gabrielewsky, Klein, McIntosh en Fildes, enz). Hier wordt de lucht weggezogen door een zuigpomp of H_2 of N_2 doorgeblazen; de aan den glaswand nog klevende O_2 , wordt tenslotte door een mengsel van Pyrogallol-Kali, Phosphor, enz. geabsorbeerd.

De afzonderlijke Petri-schaal O_2 vrij te maken is het streven van velen geweest (Hammerl, Dreuw, Lentz, Heim, Knorr, Wilson, Küster, McLead, enz.). Het principe hierbij was steeds het volgende: filtreerpapier in ringen of schijven, watten, viltringen, gedrenkt in Pyrogallol worden van binnen om de plaat gelegd; op het laatste oogenblik wordt KOH ingegoten; de afsluiting der schaal met genten voedingsbodem, geschiedt door gummi-ringen of randen. Lentz was degene die het eerst de *Plastiline* als afsluitmiddel invoerde.

De culturen ontstonden inderdaad op het plaat-oppervlak, maar ideaal waren deze methoden allesbehalve. Afgezien dat de werkwijze omslachtig was, veel kans op morsen gaf met de bijtende vloeistoffen, liep het bruine pyrogal-kalivocht overal door de plaat heen, spatte tegen den voedingsbodem op bij opnieuw toetreden van lucht en was het resultaat bij het openen der plaat, een vieze, bruine morsboel, die veel omzichtigheid vroeg en het werken allesbehalve tot een genot maakte.

De spitsvondig uitgedachte „biologische” methode van Fortner scheen de zoo zeer gewenschte oplossing te brengen; ideaal voorbeeld van „Symbiose” waar het intens zuurstof-*begeerige* micro-organisme de O_2 wegneemt voor het zuurstof-*schuwende* organisme. Een eenvoudige techniek en een zekere bedrijfs-*reinheid* waren hier gewaarborgd.

Toch leest men steeds in de literatuur dat deze „biologische” methode voor het „natieve” anaerobiontische materiaal in den steek laat, hetgeen zich wel laat begrijpen.

De nog niet gekweekte anaerobiont, die zich dus nog niet heeft kunnen aanpassen aan kunstmatige verhoudingen, is *uiterst gevoelig* voor den zuurstof, en dat is juist het organisme waarmede men in het natieve materiaal te maken heeft. Daarenboven hebben wij bij de Fortner-plaat nog te maken met de z.g. „lag-time” van den O_2 -verbruiker, in casu Bac. Prodigiosus, m. a. w. de tijd die verloopt tusschen het geënt zijn op den voedingsbodem en het „aanslaan” van den groei, een tijdsverloop dat net genoeg kan zijn om den anaerobiont, die al dien tijd aan de volle inwerking van de hem zoo giftige zuurstof blootstaat, zoo te schaden, dat hem dit noodlottig wordt en groei uitblijft. Toch geeft deze methode fraaie resultaten voor den reeds geïsoleerden anaerobiont, die zich reeds wat heeft aangepast aan de abnormale cultuur-verhoudingen.

Duidelijk wordt het dus, dat de groei-mogelijkheid op het plaat-oppervlak een zoo *snel mogelijke* eliminatie van den zuurstof vraagt en dat gaat ontegenzeggelijk op *chemische* wijze sneller dan op „biologische” wijze. Onderstaande „chemische” methode, die ik hier nader omschrijven wil kan daartoe op eenvoudige en „reine” wijze in staat stellen. De chemische absorbtie van den zuurstof geschiedt ook hier door het samenvloeien van Pyrogallol en Kaliloog in bepaalde verhoudingen, het ontstaan van Pyrogalzure-kali.

Hoofdeisch bij een dergelijk gebeuren is, dat de beide vloeistoffen *gescheiden blijven*, totdat hermetische afsluiting van het vat

heeft plaats gevonden; eerst dan mag samenvloeiing der vloeistoffen plaats vinden teneinde de alleen *in het* besloten vat aanwezige O_2 te kunnen opnemen. De juiste verhouding in concentratie en volume van de Pyrogallol tenopzichte der KOH luistert naar bepaalde wetten, wil de *maximale* O_2 -resorbtie plaats vinden. Door mij destijds dienaangaande genomen proeven, onder contrôle van den barometer ¹⁾ hebben bewezen, dat dit nauw luistert en men niet zoo maar van beide reagentia wat bij elkaar kan voegen.

Ook bij deze proef werd daarmede nauwkeurig rekening gehouden; ook gebruike men het Pyrogallol in *vloeibaren* toestand en niet in vasten; een 44% Pyrogallol-oplossing tenopzichte van een 20% KOH-oplossing en wel in een verhouding van $\pm 1 : 3$ in een *dunne laag* van *grootte oppervlakte*, waarborgt de snelste O_2 -resorbtie en werd hier voor het plaat-oppervlak ook aangewend.

De apparatuur voor deze proef bestaat dan ook weer uit het *bakje* van den Petri-schaal en de *glasplaat*, waarop het bakje met den voedingsbodem hermetisch wordt ingesloten met een doeltreffend klei-mengsel. Er moest nu echter worden gezocht naar een soort receptaculum *op* de glasplaat, die de Pyrogallol en de KOH *gescheiden* opneemt, met de mogelijkheid dat beide vloeistoffen gemakkelijk kunnen samenvloeien, zonder bemorsing.

Rekening moest worden gehouden, dat de afstand van de agar-laag tot de glasplaat iets meer dan $\frac{1}{2}$ cm bedraagt, een geringe ruimte dus. Een *zeer lage*, grootte glazen ring was hier dus het meest aangewezen. Deze moest op de glasplaat worden vast gekit en daar begon reeds dadelijk de grootte moeilijkheid.

Welke „kit”mogelijkheden ik ook beproefde, zij hielden geen behoorlijk stand tegen het alles oplossende Pyrogalzure-Kali; de eisch was toch hier dat gedurende 5×24 uur bij $37^\circ C$ het apparaat intact moest blijven. Zelfs een kit-substantie mij door een Instrumenthandel voorgesteld als zijnde bestand tegen de scherpste zuren en alkaliën, hield ook hier geen stand; de bruine vloeistof sypelde onder den glasring door en inundeerde de geheele glasplaat.

Nam men zijn toevlucht tot waterglas, paraffine, kleimengsels, lijmsoorten, *combinaties* hiervan, zoo liep het Pyrogal-kali onder de afsluiting door en lichtte deze als intacte ring van de glasplaat af.

Alle pogingen die werden aangewend om tenslotte tot een behoorlijke bedrijfszekerheid te geraken, zal ik hier voorbij gaan en alleen het resultaat vermelden dat tenslotte tot volle bevrediging heeft geleid. Aanbeveling verdiende het verder dat *in* de plaat nog

een zuurstof-indicator werd aangebracht, om de O_2 -absorbtie te controleeren en een eventueele „lek” dadelijk aan te toonen.

Utensiliën en Reagentia van deze „ring-methode” luiden nu als volgt:

Glazenplaat ± 13 cm. $\square$ (oude photo-plaat 13×18 ook te gebruiken).

Glazen ring	}	Diam: Inw. $3\frac{1}{2}$ cm.
(ruw geslepen)		Hoogte 3 mm. (<i>niet</i> hooger)
		Dikte rand $\pm 1\frac{1}{2}$ —2 mm.

Penseel

Natron waterglas *pur* (gewone waterglas is schadelijk v/h microorganisme)

Nakiplast	}	Günther en Wagner
		Boetseerklei in staven, overal verkrijgbaar.

Harbutt's Plasticine	}	bij Firma Delius,
		Amsterdam.

Acid. Pyrogallicum 44%

KoH 20%

Zuurstof Indicator vlgs M. van Riemsdijk ¹⁾.

Om te beginnen wordt de glasplaat gereinigd met een wat met Alcohol, verticaal laten verdampen. Het waterglas wordt in porceleen schaalte geschonken.

Doormiddel van pincet wordt de glazen ring in het waterglas gedoopt en *meteen* midden op de glas-plaat gezet, licht aangedrukt. Het waterglas moet als een soort „wal” om den ring uitvloeien. De ring wordt nu in 2 kamertjes verdeeld, een *kleinere* helft en een *grootere* helft. Dit geschiedt door een eenvoudige lucifer. Voor het pasklaar maken van den lucifer wordt deze op den ring gelegd op de kleinste helft en met een mesje wordt een schuine inkeeping gegeven in het beloop van den ringrand. Snijd of knip op die plaats de lucifer door; deze moet goed passend aansluiten tusschen den ringrand. Doop nu de lucifer met pincet in het waterglas en plaats deze op de aangewezen plaats tusschen den ringrand, goed aansluiten. Het waterglas moet de luciferuiteinden goed afsluiten, opdat de beide kamertjes inderdaad voor vloeistof gescheiden zijn en blijven.

¹⁾ M. van Riemsdijk, Ueber einen neuen Sauerstoffindikator für die züchtung von Anaëroben Bacteriën und die Kultur von Anaërobionten im Allgemeinen Centr. Bl. f. Bacteriologie Abt. I orig: Bd 88 Hft 3 1922.

De „ring-plaat” wordt nu bij 37° C geplaatst voor het hard worden van het waterglas (± 15 à 20 min.).

Van Nakiplast en Plasticine worden nu dunne *ronde* reepen gemaakt met de handen (de reep Nakiplast $\pm$ de lengte van den omtrek van de Petri-schaal). Deze worden op een glasplaat eveneens bij 37° C geplaatst, voor het week worden.

De anaerobiontische voedingsbodem wordt nu opgesmolten en opgekookt (uitdrijving der lucht!); er wordt een plaat gegoten en deze op *kouden* ondergrond *spoedig* tot stollen gebracht (zoo min mogelijk aspiratie van lucht in den bodem!).

Het waterglas om den ring zal nu wel hard geworden zijn (met nagel even controleeren). Omgeef nu het waterglas om den ring met een laagje *plasticine*, goed aansmeren, zoodat er een gelijkmatig walletje ontstaat. Met penseel dit laagje plasticine goed bestrijken met natron-waterglas. Dit geschiedt niet alleen voor de doelmatige afsluiting die wij hier noodig hebben, doch ook voor het „steriel” maken van de plasticine, die zoo dicht bij den voedingsbodem komt te liggen en die door de weinig „steriele” vingers werd uitgesmeerd. Plaats de ring-glasplaat opnieuw in broedstoof 37° C voor het hard worden van dit laagje waterglas.

Bereid nu de zuurstof-Indicatorvloeistof en het Hydrophielgaasje	} 3 ccm 10% glucose-oplossing } 1 drupp. Methyleenblauw } 1 „ N NaoH uit T.K. fleschje.	} Methyl. Bl. Höchst 50 mgr } Aqua Dest. 30 ccm

Neem ring-glasplaat uit broedstoof; het waterglas is al reeds hard geworden en flambeer nu de glasplaat *rondom* den ring *voorzichtig* boven den Bunsenbrander, totdat deze niet meer beslaat.

Leg het gedrenkte Indicator-hydrophielgaasje met pincet op glasplaat neer, dicht bij den ring, en spreid dit vlak uit.

Druppel nu met pipet de 44% Pyrogallol-oplossing in het *kleinste* ring-kamertje, tot *bijna* aan rand.

Giet vervolgens uit maatglaatsje de 20 KOH in *grootste* ring-kamertje, tot *bijna* aan rand.

Ent den voedingsbodem in het Petri(schaal)bakje met het anaerobiontische materiaal op de oppervlakte (snell!).

Plaats nu meteen het geënte voedingsbodem-bakje *omgekeerd* op de ring-glasplaat, en sluit nu zoo *spoedig mogelijk* hermetisch in. Daartoe legge men de dunne reep Nakiplast uit broedstoof *om* den schaalrand heen en verwrijf deze innig met de glasplaat, zoo

snel mogelijk, opdat er een zuivere afsluiting tusschen bakje en glasplaat ontstaat; dit kan in enkele minuten klaar zijn, (de fijnere afwerking volgt later; bedenk steeds dat het micro-organisme zoo *kort mogelijk* aan de O_2 bloot staat).

Nu eerst kan de Pyrogallol en de KOH worden vermengd, hetgeen voorzichtig moet geschieden: men neemt daartoe de glasplaat tusschen beide handen en neig nu voorzichtig de beide vloeistoffen tot elkaar, meng zoo goed mogelijk. De vloeistoffen blijven in het ring-bakje (groot, dun oppervlak) en de O_2 -resorbtie heeft intens plaats.

Is het noodig de Nakiplast-rand nog wat te voorzien en fraaier te maken, zoo kan men dit nu rustig doen; de zuurstof is bezig te verdwijnen! Plaats nu de ring-glasplaat bij $37^\circ C$ in den broedstoom, vooral *vlak* houden; een wit papiertje onder den kant van het Indicator-gaasje doet de kleuromslag duidelijker zien.

Het Indicator-gaasje geeft precies aan hoe de O_2 -toestand in het afgesloten vat zich verhoudt. Is de afsluiting hermetisch, zoo treedt na eenigen tijd totale ontkleuring van het gaasje op; bij „lek” treedt terstond blauwkleuring op. De verhoogde druk van buiten zal de Nakiplast nog sterker aandrukken.

Na 24—48 uur treedt fraaie oppervlaktegroei van den anaerobiont op.

Zooals reeds eerder beschreven, is de reactie-snelheid van dezen zuurstof-Indicator 20 min., deze tijd mag dus steeds worden afgetrokken van het totale tijdsverloop der ontkleuring.

De groote gevoeligheid van dezen Indicator ($\frac{2}{5}$ mm O_2 worden er nog door aangegeven) is voldoende waarborg voor haar gebruik.

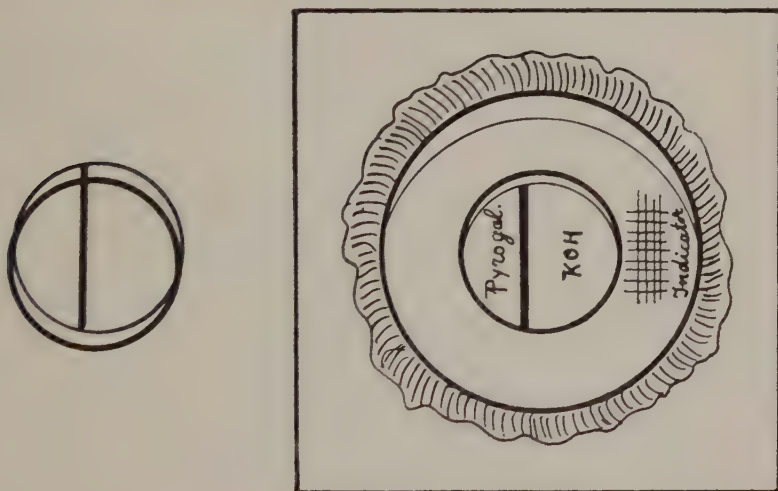
Zoo noodig kan de plaat 5 à 7 $\times$ 24 uur bij $37^\circ C$ verblijven; de ring-afsluiting houdt stand.

Het „aflichten” (demonteeren) van de Petri-schaal van de glasplaat voor de afentingen, moet volgens bepaalde aanwijzingen geschieden, willen er geen onaannemelijkheden optreden.

Door de vrij sterke buitendruk is de kans groot, dat bij onvoorzichtig en abrupt verwijderen der Nakiplast de lucht zoo snel naar binnen zuigt, dat de Pyrogal-Kali tegen den voedingsbodem opspat. Dit moet op alle manieren worden vermeden. Men verwijdere dus met een mesje een klein gedeelte van de Nakiplast, make een heel kleine „porte d'entrée” en wacht af. Het blauw worden van het Indicator-gaasje is een maatstaf voor de luchttoetreding. Is het gaasje duidelijk blauw, zoo verwijdert men de Nakiplast in totaal,

schuift de Petri-schaal eerst iets *terzijde* en licht het bakje tenslotte omhoog, vangt het dan op in een steriele Petri-deksel; de verdere bewerkingen kunnen dan plaats vinden.

Na het kweken van *pathogeen* materiaal, moet de ring-glasplaat gedesinfecteerd kunnen worden; de kans is immers groot dat infectieus condenswater op de glasplaat druppelt. Ter desinfectie legt men de ring-glasplaat in zijn geheel in bakje, met b.v. 2% Creoline-oplossing. Na ± 24 uur heeft de ring losgelaten en kan men alles verder via een zeep-oplossing behoorlijk reinigen. De waterglas-resten op glas-plaat en ring worden met mesje verwijderd. Voor de desinfectie is het een groot voordeel dat de „ring” niet vastgekit is, deze dus volkomen te reinigen is. Bij een gekitte ring is de kans er steeds dat infectieus materiaal tusschen den rand inkruipt en niet voldoende voor ontsmetting bereikbaar is.



Deze ring-apparatuur zou men zich ook kunnen denken als dikke, b.v. $\frac{1}{2}$ cm dikke glas-plaat, waarin het „ring-bakje” is *ingeslepen*; het bakje vertoont zich dus als „verdieping” in den glas-plaat. De lucifer-verdeeling kan daarin eveneens plaats vinden.

Het is echter niet twijfelachtig of een dergelijk apparaat zal oneindig kostbaarder zijn dan het zelfvervaardigde, dat met zoo geringe hulpmiddelen te maken is.

Het maakt wellicht een vreemden indruk, dat tegelijk gebruiken van Nakiplast en Plasticine, beide kleisoorten. Bewezen is echter dat

Plasticine te *zacht* is voor de buiten-plaat afsluiting, terwijl Naki-plast weer den ring-rand niet voldoende beschut; de kleveriger plasticine hier juist op haar plaats is.

Heeft men veel materiaal te verwerken, m. a. w. verscheidene Petri-schalen tegelijk noodig, zoo spreekt het vanzelf dat men dan de „stopflesch” of „klok-methode” toepast.

Voor weinig materiaal echter, voor een oriënteerende enting of voor onderwijsdoeleinden geeft deze eenvoudige methode alles wat men noodig heeft, bij een *zeer bescheiden* gebruik (± 1 ccm.) van de min of meer *kostbare* Pyrogallol.
